

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
FACULTAD DE BIOLOGÍA



**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL, PARASITOLOGÍA,
ECOLOGÍA, EDAFOLOGÍA Y QUÍMICA AGRÍCOLA**

TESIS DOCTORAL

**Mecanismos celulares y moleculares de la patología
vascular de la dirofilariosis cardiopulmonar.
El papel de las filarias y de los endosimbiontes del
género *Wolbachia*.**



Rodrigo Morchón García

Salamanca, 2008

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
FACULTAD DE BIOLOGÍA



**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL, PARASITOLOGÍA, ECOLOGÍA,
EDAFOLOGÍA Y QUÍMICA AGRÍCOLA**

TESIS DOCTORAL

**Mecanismos celulares y moleculares de la patología
vascular de la dirofilariosis cardiopulmonar.
El papel de las filarias y de los endosimbiontes del
género *Wolbachia*.**

Tesis Doctoral presentada por el Licenciado **D. Rodrigo Morchón García** para optar a la Mención de Doctorado Europeo en Ciencias Biológicas por la Universidad de Salamanca.

Salamanca, 2008.

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
FACULTAD DE BIOLOGÍA



**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL, PARASITOLOGÍA, ECOLOGÍA,
EDAFOLOGÍA Y QUÍMICA AGRÍCOLA**

TESIS DOCTORAL

**Mecanismos celulares y moleculares de la patología
vascular de la dirofilariosis cardiopulmonar.
El papel de las filarias y de los endosimbiontes del
género *Wolbachia*.**

Una firma manuscrita en tinta azul, que parece ser la de Rodrigo Morchón García.

Fdo.: Rodrigo Morchón García

Salamanca, 2008.

D. Fernando Simón Martín, Profesor Titular de Parasitología de la Universidad de Salamanca, **Dña. Alicia Rodríguez Barbero**, Profesora Contratada Doctora de la Universidad de Salamanca y **D. Jesús López Belmonte**, Doctor en Bioquímica por la Universidad de Barcelona,


CERTIFICAN:

que la Tesis Doctoral titulada *Mecanismos celulares y moleculares de la patología vascular de la dirofilariosis cardiopulmonar. El papel de las filarias y de los endosimbiontes del género Wolbachia* ha sido realizada bajo su dirección por **D. Rodrigo Morchón García**, licenciado en Ciencias Biológicas por la Universidad de Salamanca con D.N.I. 07878797-D, en el Área de Parasitología del Departamento de Biología Animal, Parasitología, Ecología, Edafología y Química Agrícola de la Universidad de Salamanca. Dicha Tesis Doctoral reúne las condiciones necesarias para ser defendida y optar a la mención de “*Doctor Europeo* en Ciencias Biológicas por la Universidad de Salamanca”.

Y para que así conste, a los efectos legales, expiden y firman el presente certificado en Salamanca, a 23 de Junio de 2008.



Fdo.: **Fernando Simón Martín**



Fdo.: **Alicia Rodríguez Barbero**



Fdo.: **Jesús López Belmonte**

Rodrigo Morchón García ha sido beneficiario de una **Beca de colaboración** asociada a un proyecto art. 83 L.O.U. durante un año (2002-2003), una **Beca de postgrado del Programa Nacional de Formación de Profesorado Universitario (FPU)** por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (AP2003-1760) durante 4 años (2004-2008) y una plaza de **Profesor Ayudante** adscrito al Área de Parasitología por la Universidad de Salamanca en la actualidad (2008).

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología a través del proyecto SAF2003-05829 (2003-2006) y de la Agencia de Desarrollo Económico de Castilla y León, cofinanciado con fondos FEDER, mediante un proyecto Art. 83 L.O.U. con la empresa Chemical Ibérica Productos Veterinarios, S.L. (2007-2009).

**”Abatido el tremendo
chopo
desplomado
igual que los más puros
al sol
y a las ortigas
su vida fue
soportadora
señal del horizonte
pájaros habitaron su
belleza
ahora en tierra
su ala de verdura y sombra
yace
su ausencia
miras.”**

“... una persona que creía profundamente en la democracia, en Castilla y en los
castellanos. Amaba como pocos su tierra, Villamuriel de Cerrato, donde tenía
firmemente asentadas sus raíces, y desde ese terruño del que conocía todos sus rincones
extendía su amor a Castilla, y en los fríos días invernales lucía siempre con orgullo la
bufanda con los colores y la enseña de nuestra tierra.”

En recuerdo de Luís Ángel Morchón Collado.

Norte de Castilla.

Palencia, 29 de Noviembre de 2007.

Fernando Zamora, Emilio González, Albano de Juan.

A Néstor y Paquita

A Alba.

A Cristina.

A Benjamina y Esther.

A Cristina Ramos Pérez.

A Luis Ángel Morchón Collado.





“Dicen que no queda nada por descubrir, que ya está todo inventado. Dicen que sólo hay un camino a seguir, que aquí estamos de paso. Dicen que si juegas tienes que jugar a ganar, que eres lo que tienes y que tienes lo que te mereces. Dicen que es así. Yo he venido a este mundo a averiguar, a intentar cambiar las cosas, a jugar, y si juego es porque me gusta jugar. No soy ni más ni menos, ni sé qué es lo que me merezco. Sé que no se nada o lo que es lo mismo, y a veces dicen, dicen, dicen y no saben lo que dicen.”

El trabajo de esta Tesis me ha servido, entre otras cosas, para ver la cantidad de gente que está dispuesta ayudar y para lo que es más importante, darme cuenta de que sé leer, ver, grabar, observar, hablar, reír, animar, reivindicar, negociar, aportar, memorizar, retener, oír, escuchar ¡o más!

Al Dr. Fernando Simón Martín. En él está la esencia de lo que es ser un buen parasitólogo y científico, que no es lo mismo. Siendo menos de 2,5 *ó más de nota media, con ganas de trabajar, de investigar...*” me ofreció estar a sus órdenes, algo inusual en ésta *nuestra universidad*. Ha sido y sigue siendo todo un honor. Su dedicación, sus consejos, su comprensión, su forma de enseñar y mil cosas más han dado como resultado, entre otras cosas, esta memoria. No me puedo olvidar de M^a Victoria, Fernando, Juan, Luís y el resto del núcleo familiar.

A mis padres, Néstor y Paquita, y a mi hermana Alba. Lo diré una y mil veces, esto es por y para ellos, sin lugar a dudas. Después de haber pasado muchos calvarios y dolores de cabeza, al final, ha valido la pena. Bioquímica, no sé si lo terminaré, pero esto ya está visto para sentencia. Gracias a vosotros soy lo que soy. Os quiero un montón. Y que sepáis que aún puedo dar mucho más de sí. Por cierto, Alba, Doña *futura fisioterapeuta* de la saga familiar, podrías hacer una de éstas, ¿no?

A Cristina. Por aparecer, por estar a mi lado, por llamarme, por hacerme ver las cosas desde otro punto de vista, por empujarme, por acompañarme, por ser así, por hacerme reír, por los libros de una página diaria y por setecientas mil cosas más. Mil besazos.

A la Dra. Alicia Rodríguez Barbero. Por su ayuda, sus razonamientos científicos, su ánimo y sus ganas de querer hacer siempre cincuenta mil cosas. Las victorias y las derrotas deben ser siempre compartidas. Te habrás dado cuenta que lo de mirar para otro lado no va conmigo, ¿verdad? Espero y deseo que haya sido así.



Al Dr. Jesús López Belmonte. Por dar conmigo los primeros pasos y hacerme ver lo duro qué es esto de la investigación.

A los doctores Chiara Bazzocchi y Michele Mortarino y de forma muy especial a Laura H. Kramer, Giulio Grande (Parma) y Claudio Genchi (Milán). Gracias por hacerme partícipes de vuestro trabajo, por convertir lo difícil en fácil, por vuestra ayuda incondicional, por abrirme las puertas de vuestra casa y ser tratado como uno más. Es también un deber, y no una obligación, mencionar a Gabriella Cancrini (Roma), Santiago Mas Coma, M^a Dolores Bagues (Valencia), Alberto Montoya (Las Palmas de Gran Canaria) y Basilio Valladares (Tenerife) que en sus respectivas ciudades me han hecho sentir como en la mía. A todos ellos, gracias por su amabilidad, su disponibilidad y por sus ganas de trabajar. Y para finalizar la tanda de doctores, no podía dejar de pasar la ocasión sin mostrar mi agradecimiento a Severiano Fernández Gayubo. Ahora sí, ¡los mosquitos están perfectamente montados!

A Javier Ramírez y Alberto H. Gudino. Por su ayuda, su interés y su preocupación por nuestro laboratorio durante todos estos años.

A mis amigos/as, los incondicionales de siempre, ¡en el año de las miles de bodas! Alberto Ruibal, Gorka, Pablo, Chuchi, Alex, Pedro, Nacho, Benito, Lorena, Chema, Virginia, Valentín, Ana Mínguez, Alberto Ramos, Jose, Ramón y Ángel Juan.

Al gremio de Parasitología. A Belén, por saber y querer escucharme en los momentos más difíciles y servirme de apoyo. Pasan los años y seguimos como siempre. Me alegro. Lo sabes mejor que nadie. Además, ¿cómo hubiera sido mi vida matutina sin un café con leche, un zumo de naranja, un San Jacobo, el Marca y la lectura del horóscopo matinal? A Fariborz, que entre mudanzas y pipetas se ha convertido en un gran amigo y compañero de trabajo. ¡Por favor! Gracias por todos estos años. Una cosa sí es cierta: ¡tú estás más gordo que yo! A la Dra. M^a del Mar Siles, por sus consejos y su ayuda a cualquier hora, lugar y día. Gracias por darme las miles de visiones de ésta “mi Tesis Doctoral”. Si supieras lo que se te echa de menos... ¡Vuelve! A Javi, por ser ese compañero que sabe ser científico, Manolo (y yo Benito), actor, cantante... y lo que es más difícil, cada cosa en su momento. Gracias por los mil y un favores que te debo. Un placer. A Cristina, que cada vez que cambio las cosas de sitio, por fin, me comprende y entiende o se apiada de mí. ¡Ahora eres la siguiente en escribir el cuento de *las gallinas felices*! Perdón, gallinas ponedoras de huevos. A Elaine, por sus clases



de inglés, portorriqueño y ochocientas mil cosas más. A la Dra. Martha Nelly Montoya, ¡mi madre putativa! Ha sido un placer haber aprendido y compartido cosas contigo. A Ana Lucía, por su apoyo incondicional en todo momento y ¡por sus miles de dibujos y llaveros! Y al resto de mi querido y respetado *Portal de Belén de Parasitólogos Salmantinos*: a Antonio Muro y Antonio Encinas (los otros dos Reyes Magos, Melchor y Baltasar), a Julio y Verónica (sus respectivos pajes), a Amparo (la *bonitiña* pata madre con samba brasileña), a Ana (la lavandera) y a Pedro (San José). Gracias por estar ahí para cualquier cosa, sobre todo, por las cenas de Navidad y las de los congresos (que no nos perdemos uno) y por ser cómplices del Belén más premiado del 1^{er} certamen de Belenes de nuestro gran área, Parasitología.

A mis otros compañeros de laboratorio, M^a Paz (*compa*, se te echa de menos. ¡Vuelve! Bueno no, mejor voy yo), David y Nacho de Fisiología Vegetal, Belén y María del Departamental-Universidad del País Vasco, Cristina y Rebeca de Microbiología, Miguel, Omar, Carlos en representación del S-15, 18 y 19, a Soraya... y sobre todo a Maite (¡tú sí que vales!) de Fisiología Animal, a Dani y Víctor de la Universidad de La Laguna (aunque uno me llame peninsular y el otro extranjero. Eso sí, tener siempre en cuenta ¡quién os conquistó!) y a Hugo, por haber hecho que mi estancia en Milán fuera perfecta.

A D. José Manuel Latorre (Universidad de Valencia) y a la Dra. Dña. Rosario Melero Alcívar (Instituto Carlos III, Madrid). Un valenciano y una madrileña. Ahí es nada. Gracias a ellos descubrí Valencia y Madrid con otro color. Una cosa es segura, ¡el cazar mosquitos une!

A mi familia al completo, tíos, tías, primos, primas (no nombro a nadie porque sino tendría que llenar dos folios más). Mención *Honoris Causa* a mis 2 abuelas, Benjamina y Esther y sus millones de besos. Dejo un hueco para mis madrinas, Susana e Isabel Rosa y para mi padrino ovetense Manolo. A mi tío, Luis Ángel Morchón Collado y a mi *prima*, Cristina Ramos Pérez. Que todo salga bien.

Y por último, a los Celtas Cortos, a Los Serrano y a mi perro *el Juli* (que fue antes el perro que el torero). Sin ellos, muchos de los momentos vividos... ¡se me habrían olvidado!

Y como siempre, disculpen las molestias aquellos o aquellas que no aparecen en este trabajo. *Evidentemente* será un error de imprenta. ¡Nos vemos en los bares!

- µg:** Microgramos.
- 5-HPETE:** 5-hidroxieicosatetranoico.
- 5-LO:** 5-lipooxigenasa.
- AA:** Ácido araquidónico.
- Ac:** Anticuerpo.
- ADN:** Ácido desoxirribonucleico.
- Ag:** Antígeno.
- AMPc:** Adenosín monofosfato cíclico.
- BSA:** Albúmina de suero bovino.
- CO₂:** Dióxido de carbono.
- COXs:** Ciclooxygenasa.
- COX-1:** Ciclooxygenasa-1.
- COX-2:** Ciclooxygenasa-2.
- DAG:** Diacilglicerol.
- Di₂₂:** Péptido sintético derivado de la molécula de 22 kDa.
- Di₃₃:** Péptido sintético derivado de la molécula de 33 kDa.
- D. immitis:** *Dirofilaria immitis*.
- D. repens:** *Dirofilaria repens*.
- Dipp:** Pool de 6 péptidos sintéticos de *Dirofilaria immitis*.
- DiSA** Antígeno somático de *Dirofilaria immitis*.
- DiSA-:** Células endoteliales no tratadas con DiSA.
- DiSA+:** Células endoteliales tratadas con DiSA.
- DMSO:** Dimetil sulfóxido.
- D.O.:** Densidad óptica.
- E-cadherina:** Cadherina endotelial.
- E-selectina:** Selectina endotelial.
- EDTA K₃:** Ácido etilendiamina tetraacético tripotásico.
- ECGS:** Factor de crecimiento endotelial.
- EGF:** Factor de crecimiento epitelial.
- EGFR:** Receptor del factor de crecimiento epitelial.
- ELISA:** Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*).

ELISA anti-WSPr: ELISA de anticuerpos contra *Wolbachia*.

ELISA anti-Dipp: ELISA de anticuerpos contra Dipp.

EEM: Error estadístico medio.

ETT: Epoxieicosatetranoico.

FBS: Suero fetal bovino.

FITC-dextrano: Fluoresceina-isotiocianato acoplado a dextrano.

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno.

HAAE-1: Línea de células endoteliales humanas procedentes de aorta.

HETE: Hidroxieicosatetranoico.

HMC: Complejo principal de histocompatibilidad.

HRP: Peroxidasa de rábano.

ICAMs: Moléculas de adhesión intercelulares.

ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular-1.

ICAM-2: Molécula de adhesión intercelular-2.

ICAM-3: Molécula de adhesión intercelular-3.

IgG: Inmunoglobulina G.

IL-1 Interleuquina-1.

IL-4 Interleuquina-4.

IL-6 Interleuquina-6.

IL-10 Interleuquina-10.

IL-13 Interleuquina-13.

INF- γ : Interferón- γ .

iNOs: Óxido nítrico sintasa inducible.

IP₃: Inositol 3-fosfato.

IPTG: isopropil- β -D-tiogalactopiranósido.

JAMs: Moléculas de unión adherente.

JAM-A: Molécula de unión adherente-A.

JAM-B: Molécula de unión adherente-B.

JAM-C: Molécula de unión adherente-C.

kDa: Kilodalton.

L-selectina: Selectina de leucocitos.

- L₂**: Larva de 2º estadio de *Dirofilaria immitis*.
- L₃**: Larva de 3^{er} estadio de *Dirofilaria immitis*.
- L₄**: Larva de 4º estadio de *Dirofilaria immitis*.
- LB**: *Luria Bertani*.
- LDL**: Lipoproteína de baja intensidad.
- LOs**: Lipooxigenasas.
- LPS** : Lipopolisacárido.
- LTs**: Leucotrienos.
- LTA₄**: Leucotrieno A₄.
- LTB₄**: Leucotrieno B₄.
- LTC₄**: Leucotrieno C₄.
- LTD₄**: Leucotrieno D₄.
- LTE₄**: Leucotrieno E₄.
- Mf**: Microfilarias.
- mf+**: Microfilarémicos.
- mf-**: Amicrofilarémicos.
- ml**: Mililitros.
- MMPs**: Metaloproteinasas de la matriz.
- NADPH**: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfatasa.
- ng**: Nanogramos.
- nm**: Nanómetros.
- NO**: Óxido nítrico.
- OPD**: Ortofenildiamina.
- p.i.**: Postinfección.
- p.t.**: Postratamiento.
- P-selectina**: Selectina de plaquetas.
- PBS**: Tampón fosfato.
- PBS CM**: Tampón fosfato con exceso de cloruro de magnesio.
- PCNA**: Antígeno nuclear de las células en fase de proliferación.
- PCR**: Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*).
- PECAMs**: Moléculas de adhesión entre el endotelio y las plaquetas.

PECAM-1: Molécula de adhesión entre el endotelio y plaquetas-1.

PGs: Prostaglandinas.

PGD₂: Prostaglandina D₂.

PGE₂: Prostaglandina E₂.

PGF_{2α}: Prostaglandina F_{2α}.

PGG₂: Prostaglandina G₂.

PGH₂: Prostaglandina H₂.

PGI₂: Prostaglandina I₂.

PGJ₂: Prostaglandina J₂.

PIP₂: Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato.

PKc: Protein quinasa c.

PLA₂: Fosfolipasa A₂.

PLC: Fosfolipasa C.

PMSF: Fenilmetilsulfonil fluoruro.

PSA: Persulfato amónico.

PVDF: Polivinilidenofluoruro.

SDS: Dodecil sulfato sódico.

Respuesta Th₁: Respuesta T *Helper* 1.

Respuesta Th₂: Respuesta T *Helper* 2.

ROS: Reactivos derivados del oxígeno.

Test IDEXX: Test de antígenos circulantes de *D. immitis*.

Test HESKA: Test de anticuerpos circulantes de *D. immitis*.

TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina.

TNF-α: Factor de necrosis tumoral-α.

Txs: Tromboxanos.

TxA₂: Tromboxano A₂.

TxB₂: Tromboxano B₂.

UA: Unidades arbitrarias.

UFE: Unidades de fluorescencia emitida.

URL: Unidades de luz relativas.

VCAMs: Moléculas de adhesión a células vasculares.

VCAM-1: Molécula de adhesión a células vasculares-1.

VE-cadherina: Cadherina endotelial vascular.

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular.

WSPr: Proteína mayoritaria de la superficie de *Wolbachia* recombinante en su forma recombinante.

WSPr-: Células endoteliales no tratadas con WSPr.

WSPr+: Células endoteliales tratadas con WSPr.



ÍNDICE DE CONTENIDOS



INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
1. Sistemática y filogenia.....	7
2. Morfología y biología de <i>D. immitis</i>.....	7
2.1. El parásito.....	7
2.2. La bacteria endosimbionte <i>Wolbachia</i>	12
3. Extensión de la dirofilariosis animal y humana.....	13
3.1. Distribución de la dirofilariosis animal.....	13
3.2. Cambios en el patrón de distribución de la dirofilariosis animal.....	17
3.3. Distribución de la dirofilariosis humana.....	19
3.4. Nuevos modelos de predicción de la dirofilariosis.....	22
4. Patología de la dirofilariosis cardiopulmonar.....	23
4.1. Daños vasculares.....	25
4.2. Daños pulmonares.....	26
4.3. Daños cardíacos.....	27
4.4. Patología aguda.....	28
4.5. Sintomatología.....	29
4.6. Dirofilariosis felina.....	29
4.7. Dirofilariosis humana.....	30
5. El endotelio vascular.....	31
5.1. Mediadores moleculares producidos por el endotelio vascular en relación con la inflamación.....	32
5.1.1. <i>Eicosanoides. Aspectos generales</i>	32
5.1.2. <i>Los eicosanoides en las filarias y otros helmintos parásitos</i>	36
5.2. Moléculas de adhesión de las células endoteliales. Aspectos generales..	38
5.2.1. <i>Inmunoglobulinas de tipo C</i>	40
a) Moléculas de Adhesión Intercelulares (ICAMs).....	41
b) Moléculas de Adhesión a Células Vasculares (VCAMs).....	42
c) Moléculas de Adhesión entre el endotelio y las plaquetas (PECAMs)	42
d) Moléculas de Adhesión de Unión Adherente (JAMs).....	43



5.2.2. Integrinas.....	43
5.2.3. Selectinas.....	44
5.2.4. Cadherinas.....	45
5.3. Otras moléculas producidas por las células endoteliales.....	46
5.3.1. Óxido nítrico.....	46
5.3.2. Factor de crecimiento endotelial vascular.....	47
5.4. El endotelio vascular en algunas parasitosis.....	48
6. El diagnóstico de la dirofilariosis en los distintos hospedadores.....	50
6.1. Diagnóstico de la dirofilariosis cardiopulmonar canina y felina.....	50
6.2. Diagnóstico de la dirofilariosis pulmonar humana.....	53
7. Clasificación clínica, tratamiento y profilaxis de la dirofilariosis animal.....	54
8. Medidas preventivas para el hombre.....	59
OBJETIVOS.....	61
MATERIALES Y MÉTODOS.....	65
1. Estudios en hospedadores naturales.....	67
1.1. Muestras de sangre.....	67
1.1.1. Perros.....	67
1.1.2. Gatos.....	67
1.1.3. Humanos.....	68
1.2. Obtención de sueros.....	69
1.3. Preparación de antígenos.....	69
1.3.1. Extracto antigénico de vermes adultos de <i>D. immitis</i>	69
1.3.2. Péptidos sintéticos derivados de <i>D. immitis</i>	70
1.3.3. Proteína recombinante de la cubierta de <i>Wolbachia</i>	70
1.4. Cuantificación de proteínas.....	72
1.5. Técnicas relacionadas con la selección de muestras de suero.....	72
1.5.1. Test de Knott.....	72
1.5.2. Tests comerciales de diagnóstico.....	72
1.5.2.1. Test para la detección de antígenos circulantes de <i>D. immitis</i>	72



1.5.2.2. Test para la detección de anticuerpos anti- <i>D. immitis</i>	73
1.5.3. Enzimo inmuno ensayo (ELISA) para la detección de anticuerpos anti- <i>Dirofilaria immitis</i> y anti- <i>Wolbachia</i>	73
1.6. Criterios de clasificación de los hospedadores incluidos en el estudio...	74
1.7. ELISAs comerciales para la detección de los eicosanoides PGE ₂ , TxB ₂ y LTB ₄	75
1.8. Inmunohistoquímica.....	75
1.8.1. Inclusión en parafina y preparación de las secciones.....	75
1.8.2. Procesado de las secciones.....	76
2. Estudios en cultivos de células endoteliales.....	77
2.1. Células endoteliales vasculares.....	77
2.2. Técnicas de cultivo.....	78
2.2.1. Tripsinización.....	78
2.2.2. Recuento celular.....	78
2.2.3. Congelación y descongelación celular.....	78
2.3. Expansión del cultivo celular.....	79
2.4. Condiciones del cultivo y recogida de muestras.....	81
2.4.1. ELISAs comerciales, Western Blot, ensayo de citotoxicidad, ciclo celular, apoptosis, necrosis y migración celular.....	81
2.4.2. Inmunofluorescencia.....	81
2.4.3. Permeabilidad a moléculas.....	81
2.4.4. Ensayos de proliferación celular mediante la técnica de cristal violeta.....	82
2.5. Condiciones de tratamiento de los cultivos celulares.....	82
2.6. Western blot.....	82
2.6.1. Obtención de extractos proteicos a partir de cultivo de células endoteliales.....	83
2.6.2. Cuantificación de proteínas.....	83
2.6.3. Electroforesis.....	83
2.6.4. Electrotransferencia.....	84
2.6.5. Bloqueo.....	84
2.6.6. Revelado.....	85



2.6.7. <i>Análisis de las bandas</i>	86
2.6.8. <i>Stripping</i>	86
2.7. Ensayos de citotoxicidad.....	86
2.8. ELISA para la detección de NO.....	87
2.9. Inmunofluorescencia.....	87
2.9.1. <i>Marcaje celular de ICAM-1, VCAM-1 y PECAM-1</i>	87
2.9.2. <i>Marcaje celular de COX-2</i>	88
2.9.3. <i>Marcaje celular de α-actina</i>	88
2.9.4. <i>Análisis de las muestras</i>	89
2.10. Permeabilidad a moléculas.....	89
2.11. Ensayos de proliferación celular mediante la técnica de cristal violeta.....	90
2.12. Determinación del ciclo celular.....	91
2.13. Determinación de la apoptosis y necrosis celular.....	91
2.14. Ensayos de migración.....	92
3. Análisis estadísticos	93
RESULTADOS	95
1. Clasificación de los hospedadores incluidos en el estudio <i>in vivo</i>	97
1.1. Perros.....	97
1.2. Gatos.....	98
1.3. Humanos.....	101
2. Mediadores inflamatorios en hospedadores con dirofilariosis.	
Análisis de eicosanoides	102
2.1. Eicosanoides en perros.....	102
2.2. Eicosanoides en gatos.....	104
2.2.1. <i>Gatos infectados naturalmente</i>	104
2.2.2. <i>Gatos infectados experimentalmente</i>	106
2.2.3. <i>Gatos infectados y tratados con ivermectina</i>	107
2.3. Eicosanoides en humanos.....	108
3. Diseño de un modelo experimental <i>in vitro</i> con células endoteliales vasculares	110



4. Presencia de la bacteria endosimbionte <i>Wolbachia</i> en los vermes adultos de <i>D. immitis</i>	115
5. Condiciones de tratamiento de las células endoteliales vasculares con el extracto antigénico de <i>D. immitis</i> (DiSA)	116
5.1. Puesta a punto del tratamiento	116
5.2. Estudio del posible efecto citotóxico de DiSA sobre las células endoteliales vasculares	121
6. Condiciones de tratamiento de las células endoteliales vasculares con WSPr	122
6.1. Puesta a punto del tratamiento	122
6.2. Estudio del posible efecto citotóxico de WSPr sobre las células endoteliales vasculares	126
7. Efecto de los antígenos de <i>Dirofilaria immitis</i> y <i>Wolbachia</i> sobre las células endoteliales vasculares	127
7.1. Efecto de DiSA y WSPr sobre algunas moléculas relacionadas con el metabolismo del ácido araquidónico	127
7.2. Efecto de DiSA y WSPr sobre las moléculas de adhesión del endotelio vascular	131
7.3. Efecto de DiSA Y WSPr sobre el nivel de expresión de VEGF	137
7.4. Efecto de DiSA y WSPr sobre eNOS e iNOS, enzimas responsables de la producción de óxido nítrico	138
7.5. Efecto de DiSA y WSPr sobre la permeabilidad celular	139
7.6. Efecto de DiSA y WSPr sobre la proliferación celular	142
7.7. Efecto de DiSA y WSPr sobre la apoptosis y necrosis celular	146
7.8. Efecto de DiSA y WSPr sobre la migración celular	147
7.9. Resumen de los efectos de DiSA y WSPr sobre las células endoteliales vasculares durante 24 horas	155
DISCUSIÓN	157
1. Los eicosanoides en las infecciones naturales por <i>D. immitis</i>	160



2. Actividad del extracto somático de <i>D. immitis</i> (DiSA) y la molécula dominante de la superficie de <i>Wolbachia</i> (WSPr) sobre células endoteliales vasculares.....	163
CONCLUSIONES.....	173
ABSTRACT.....	177
1. Introduction.....	179
2. Objectives.....	181
3. Materials and methods.....	181
3.1. Eicosanoid production in natural and experimentally <i>D. immitis</i> infected hosts.....	181
3.1.1. Serum samples.....	181
3.1.2. Cat experimental infections and quimioprophylaxis.....	183
3.1.3. Eicosanoid detection tests	183
3.1.4. Statistical analysis.....	183
3.2. Studies related to vascular endothelial cells.....	184
3.2.1. Cell culture.....	184
3.2.2. Exposure of endothelial cells to specific antigens	184
3.2.3. Culture media and cell lisates obtention.....	184
3.2.4. Tests for eicosanoids analysis.....	185
3.2.5. Western Blot.....	185
3.2.6. Transendothelial exchange.....	185
3.2.7. Cytotoxicity assays.....	186
3.2.8. Proliferation assays.....	186
3.2.9. Cell migration assays.....	186
3.2.10. Apoptosis and cellular necrosis assays.....	187
3.2.11. Statistical analysis.....	187
4. Results.....	187
4.1. Eicosanoids production in natural and experimentally <i>D. immitis</i> infected hosts.....	187
4.1.1. Eicosanoids in dogs.....	187
4.1.2. Eicosanoids in cats.....	188



4.1.3. <i>Eicosanoids in humans</i>	191
4.2. Development of an <i>in vitro</i> experimental culture model with vascular endothelial cells.....	192
4.3. <i>D. immitis</i> antigenic extract (DiSA) and recombinant <i>Wolbachia</i> surface protein (WSPr) effect on the inflammation related molecules in vascular endothelial cells.....	193
4.3.1. <i>DiSA and WSPr effect on COX-2 and 5-LO enzymes and eicosanoid production</i>	193
4.3.2. <i>Effect of DiSA and WSPr on the expression of cell adhesion related molecules</i>	195
4.3.3. <i>Effect of DiSA and WSPr on the expression of iNOs and eNOs, enzymes responsible for NO synthesis</i>	196
4.3.4. <i>Effect of DiSA and WSPr on the expression of VEGF</i>	197
4.3.5. <i>DiSA and WSPr effect on endothelial permeability to molecules</i>	198
4.3.6. <i>DiSA and WSPr citotoxicity and effect on the proliferation, migration, apoptosis and necrosis of cells and cell cycle</i>	199
5. Discussion	199
6. Conclusions	204
BIBLIOGRAFÍA	205
ANEXO	245
Anexo I - Soluciones empleadas.....	247
1. Tampones generales.....	249
2. Tampones para la obtención de WSPr.....	249
3. Tampones para ELISA de IgGs.....	249
4. Tampones para Western Blot.....	250
5. Tampones para inmunofluorescencia y ciclo celular.....	252
6. Tampones para obtener extractos de proteínas celulares.....	253
7. Tampones para cristal violeta.....	253
Anexo II - Productos.....	255



Anexo III - Aparatos.....	265
PUBLICACIONES relacionadas con la tesis doctoral.....	269





Dirofilaria immitis es el agente causante de la dirofilariosis cardiopulmonar animal y de la dirofilariosis pulmonar en humanos. Afecta a las poblaciones caninas y felinas, tanto domésticas como silvestres de todo el mundo, y también se encuentra en otras especies de carnívoros. La dirofilariosis animal es una enfermedad muy compleja, progresiva y potencialmente fatal que afecta al sistema cardiorrespiratorio de los hospedadores, y puede causar, también, procesos agudos extremadamente graves, que se superponen con la patología crónica. Puesto que se trata de una zoonosis, la dirofilariosis tiene importancia tanto en sanidad animal como humana. En el hombre la infección suele pasar desapercibida. No obstante, en algunos casos, *D. immitis* origina nódulos pulmonares benignos, que pueden confundirse con carcinomas y otros tipos de lesiones pulmonares.

El hecho de que la dirofilariosis pulmonar presente lesiones similares a las causadas por otras etiologías, hace fundamental el conocimiento de esta parasitosis por parte de los médicos y es necesario disponer de métodos que permitan el diagnóstico diferencial. Por otra parte, en las sociedades desarrolladas, tanto los perros como los gatos son muy apreciados como animales de compañía, por lo que, desde hace años, se vienen realizando considerables esfuerzos en la investigación de esta parasitosis, desde el punto de vista veterinario. A todo esto hay que añadir el cambio de distribución que se está detectando en los últimos años y que está favoreciendo la introducción de la dirofilariosis animal y el aumento de casos caninos y felinos importados, en áreas consideradas no endémicas hasta el presente. Como consecuencia de ello, se han realizado importantes avances en el campo del diagnóstico y del tratamiento, con la incorporación de excelentes medicamentos y el desarrollo de técnicas quirúrgicas microinvasivas, que permiten la extracción de los vermes, cuando su número no aconseja un tratamiento filaricida. Es importante señalar que, desde el punto de vista económico, los productos relacionados con el tratamiento y control de la dirofilariosis en la Unión Europea durante el año 2003, fue estimado en 47.419.000 € y se presuponía un incremento de unos 200.000 € /año.

Sin embargo, subsisten lagunas en el conocimiento de aspectos clave de esta enfermedad, que son motivo de intensos estudios en el momento presente. Una de las más importantes, por la proyección que tiene en el control de la morbilidad y mortalidad, es la comprensión del origen de los daños, especialmente de la patología inflamatoria.



Otro aspecto, relacionado con el anterior, y que suscita gran interés, es el estudio de la respuesta inmune que desarrollan los hospedadores contra *D. immitis* y los mecanismos de las filarias para sobrevivir durante años en hospedadores inmunocompetentes.

En 1995, el equipo de investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Milán dirigido por el Prof. Claudio Genchi, *redescubrió* la presencia de bacterias endosimbiontes del género *Wolbachia* en las diversas fases evolutivas de *D. immitis* y otras especies de filarias. Las investigaciones que han seguido a este importante descubrimiento están aportando datos que evidencian, cada vez con mayor claridad, la participación de *Wolbachia* en procesos clave como la patología inflamatoria y la polarización de la respuesta inmune del hospedador, aspectos que como se señala anteriormente requieren un conocimiento más profundo.

Los estudios de nuestro grupo en el campo de la dirofilariosis, realizados durante 19 años, han permitido caracterizar parcialmente la respuesta inmune que desarrollan los hospedadores humanos, caninos y felinos contra *D. immitis*. Estos trabajos, iniciados cuando aun no se consideraba la existencia de las bacterias simbiotes, están siendo complementados con los que se llevan a cabo actualmente y en los que la clave es la presencia de *Wolbachia*.

La presente memoria incluye los últimos estudios realizados sobre diversos aspectos de la patología inflamatoria de la dirofilariosis, tanto en los reservorios animales como en humanos, haciendo especial énfasis en la puesta a punto de un modelo experimental de cultivo *in vitro* de células endoteliales que nos ha permitido estudiar por primera vez los mecanismos celulares y moleculares de las alteraciones que sufren las células endoteliales vasculares bajo la influencia de los antígenos de *D. immitis* y de *Wolbachia*.





1. Sistemática y filogenia.

Las filarias se incluyen en el Phylum Nematoda, Clase Secernentea, Orden Spidurida, Suborden Filariina, Superfamilia Filarioidea y Familia Onchocercidae. Esta Familia está constituida por dos Subfamilias: la Subfamilia Onchocercinae, con los géneros *Onchocerca*, *Brugia*, *Wuchereria* y *Mansonella*, y la Subfamilia Dirofiliariinae, en la que están incluidos los géneros *Dirofilaria* y *Loa* (Marquardt et al., 2000).

El género *Dirofilaria* está constituido por diversas especies, cuyos vermes adultos se alojan en diversas zonas de la anatomía de sus hospedadores. *D. immitis*, *D. lutrae* y *D. spectans* se localizan en las cavidades cardiacas, *D. lutrae* aparece además, en el tejido subcutáneo y *D. freitasi* en la cavidad abdominal. Dentro del género *Dirofilaria* se reconoce, también, el subgénero *Nochtiella*, con dos especies, *D. (Nochtiella) repens* y *D. (Nochtiella) ursi*, cuyos adultos se localizan en el tejido subcutáneo (Manfredi et al., 2001).

Sin embargo, los estudios filogenéticos basados en el análisis de las secuencias de diversos genes no confirman completamente esta clasificación. Empleando la región espaciadora 5S ARNr, Xie et al. (1994) mostraron que el género *Dirofilaria* está más relacionado con *Onchocerca* que con *Loa*, y que ésta es más cercana a *Mansonella*. La afinidad filogenética entre *Dirofilaria* y *Onchocerca* fue confirmada por Casiragui et al. (2001), empleando la secuencia del gen mitocondrial de la citocromo oxidasa I (COI). También se han realizado estudios basados en el análisis de varios genes de las bacterias simbioses del género *Wolbachia* presentes en las filarias, dada la especificidad de hospedador de dichas bacterias. El estudio de los genes 16S ADN, *ftsZ* y *WSP* demuestra la cercanía de las bacterias endosimbiontes de *Dirofilaria* y de *Onchocerca* (Sironi et al., 1995; Bandi et al., 1998), confirmando los resultados de Xie et al. (1994).

2. Morfología y biología de *D. immitis*.

2.1. El parásito.

El ciclo biológico de *D. immitis* se completa en dos hospedadores: uno definitivo vertebrado, que actúa como reservorio, y otro intermediario, que lo hace como vector (Figura 1).

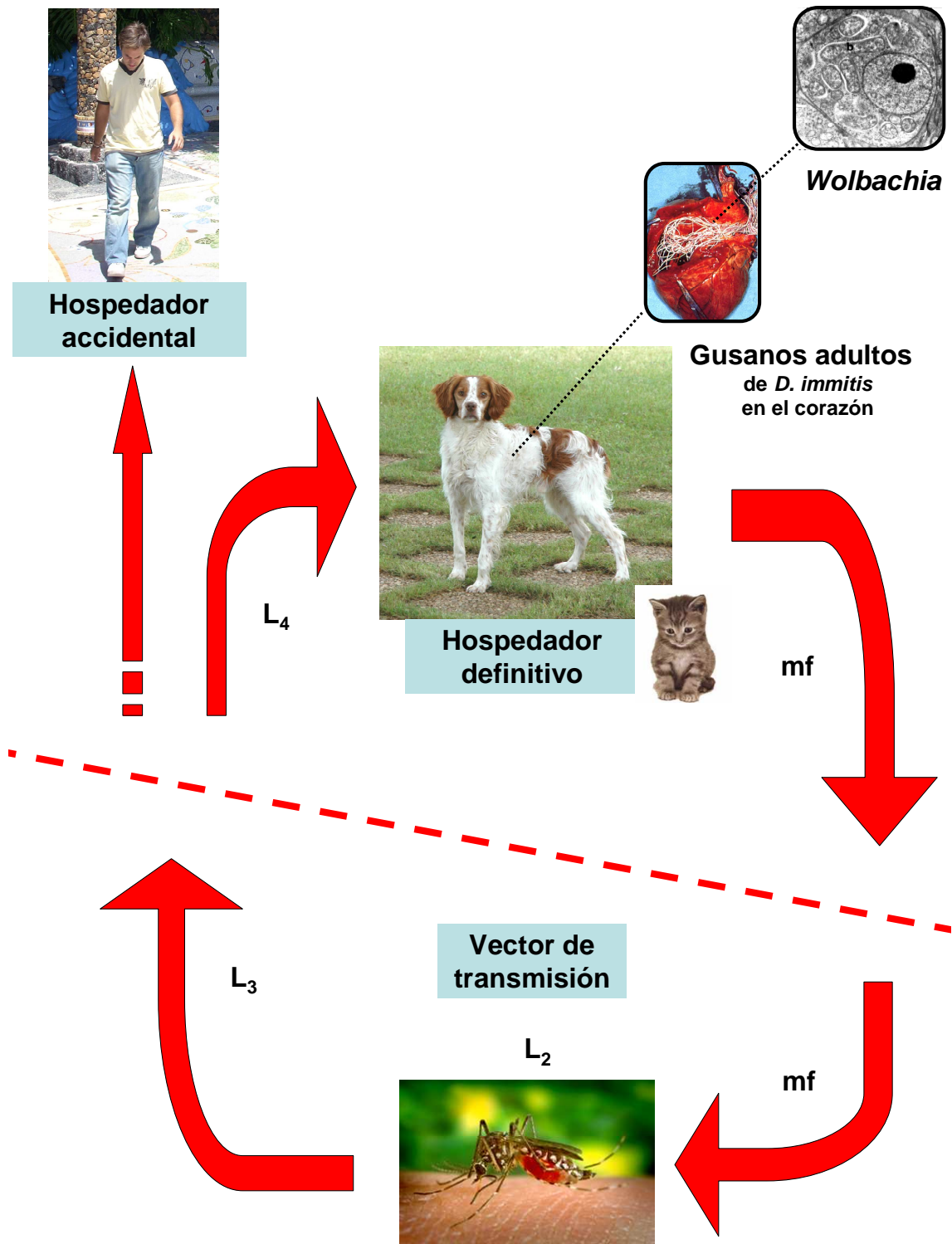


Figura 1. Ciclo biológico de *Dirofilaria immitis*. Microfilarias (mf); larva de 2^o estadio (L₂); larva de 3^{er} estadio (L₃); larva de 4^o estadio (L₄).



Los hospedadores definitivos son cánidos y félidos domésticos y silvestres (Genchi et al., 2001). El reservorio principal es el perro, aunque existen otros hospedadores que pueden realizar este papel, como el coyote o el zorro (Marks & Bloomfield, 1998; Sacks, 1998). Otras especies, como los jaguares, tigres y osos pueden albergar también el parásito (Genchi et al., 2001). El hombre también puede ser hospedador de *D. immitis*, aunque el parásito no llega a completar, habitualmente, su desarrollo, por lo que no tiene ningún significado en la transmisión (Simón et al., 2001).

La acción vectorial es ejercida por mosquitos culícidos pertenecientes a los géneros *Culex*, *Aedes*, *Anopheles*, *Culiseta* y *Coquillettidia*, entre otros (Cancrini & Kramer, 2001; Cancrini et al., 2006). Al menos 70 especies son consideradas vectores potenciales de *D. immitis* aunque, la capacidad vectorial real se ha demostrado en muchas menos (Tabla 1).

Vector	País	Referencia
<i>Aedes aegypti</i>	Polinesia francesa Argentina	Russell et al., 2005 Vezzani et al., 2006
<i>Aedes albopictus</i>	Italia Taiwán Estados Unidos	Cancrini et al., 1995 Lai et al., 2001
<i>Aedes caspius</i>	Italia	Cancrini et al., 2006
<i>Aedes notoscriptus</i>	Australia	Russell & Geary, 1996
<i>Aedes taeniorhynchus</i>	Brasil	Ahid et al., 1999 Bradley et al., 1984
<i>Anopheles maculipennis s.l.</i>	Italia	Cancrini et al., 2006
<i>Culex annulirostris</i>	Australia	Russell & Geary, 1996
<i>Culex pipiens sp.</i>	Italia España Argentina	Cancrini et al., 2006 Morchón et al., 2007a Vezzani et al., 2006
<i>Culex quinquefasciatus</i>	Brasil	Ahid et al., 1999
<i>Culex theileri</i>	Tenerife (España) Madeira (Portugal)	Datos propios no publicados Santa-Ana et al., 2006

Tabla 1. Distribución de los vectores de la dirofilariosis en diferentes partes del mundo.



En los perros, los vermes adultos se localizan en la arteria pulmonar y en el ventrículo derecho del corazón. Su cuerpo es largo y fino y presentan dimorfismo sexual. Los machos miden entre 12 y 20 cm de longitud y tienen un diámetro de 700 a 900 μm . La porción caudal es muy fina y se enrolla en espiral. Presenta numerosas papilas delante y detrás de la cloaca, 2 alas laterales estrechas y un aparato copulador con 2 espículas de tamaño desigual. Las hembras, que tienen una longitud de 25 a 34 cm y un diámetro de 1 a 1,3 mm, presentan una cola corta y redondeada. Poseen órganos sexuales dobles y la vulva se sitúa en la parte anterior. Son ovovivíparas, por lo que, después de ser fecundadas liberan al torrente circulatorio larvas de 1^{er} estadio o microfilarias (mf). Éstas carecen de vaina, presentan el extremo anterior fusiforme y una cola recta y fina. Miden entre 290 y 330 μm de longitud por 7 μm de diámetro.

Las microfilarias son ingeridas por mosquitos vectores cuando estos se alimentan sobre individuos infectados. Después de aproximadamente 24 horas, migran desde el intestino del mosquito a los tubos de Malpighi, donde comienzan a mudar. La primera de las 3 que se producen, ocurre aproximadamente, 10 días después de la infección, apareciendo la larva de 2^o estadio (L_2), que mide entre 188 y 586 μm de longitud. La siguiente muda ocurre entre el 13^o y el 15^o día después de la toma de sangre, dando lugar a la larva de 3^{er} estadio (L_3). La duración del desarrollo larvario en los mosquitos varía dependiendo de las condiciones ambientales, principalmente de la temperatura. A 28-30°C dura de 8 a 10 días, a 24°C entre 11 y 12 días, y a 22°C entre 16 y 20 días. El porcentaje de microfilarias que completan su desarrollo a L_3 puede variar entre el 0,4 y el 20%. La ingestión de larvas y su consiguiente desarrollo modifican algunos patrones del comportamiento de los vectores. Se ha demostrado que los mosquitos parasitados con más de 4 larvas incrementan su actividad voladora y, en general, son mucho más activos durante el período diario habitual de quiescencia (Cancrini & Kramer, 2001).

Las L_3 son inoculadas en el tejido subcutáneo de un nuevo hospedador, durante la siguiente toma de sangre. Los mosquitos liberan sobre la herida causada por la picadura, una gota de hemolinfa con las L_3 , que penetran en la piel del hospedador definitivo por sus propios medios. Las larvas mudan en un periodo no bien determinado, dando lugar a las larvas de 4^o estadio (L_4). Según Sawyer (1965) ocurre antes de 3 días, según Kotani & Powers (1982) entre los 3 y 9 días postinfección (p.i.) y



según Orihel (1961) entre los 9 y 12 días p.i. El cambio más significativo que ocurre en las L₄, además de un considerable aumento de su tamaño, es el desarrollo de los órganos reproductores. Las espículas y papilas genitales están parcialmente formadas y son visibles durante la fase tardía de este estadio.

La transformación en preadultos ocurre entre los 50 y los 70 días p.i. Los vermes llegan a su localización definitiva en las arterias pulmonares y el ventrículo derecho del corazón entre los 68 y 70 días p.i., completándose la llegada de todos ellos hacia el día 120 p.i. Allí finalizan su desarrollo y se produce la fecundación. Las microfilarias pueden aparecer en la sangre periférica entre los 6 meses y medio y 7 meses p.i. La microfilaremia aumenta durante los 10 meses siguientes y se mantiene constante durante varios años (7 a 9 años), desapareciendo después progresivamente. La longevidad de las microfilarias puede alcanzar los dos años (Barriga, 1982; Quiroz-Romero, 1984; McCall, 1998).

El gato es un hospedador menos susceptible y más resistente que el perro, lo que determina que el patrón expuesto anteriormente se altere y adquiriera algunas características propias. La carga parasitaria suele ser muy baja (de 1 a 3 vermes por término medio) y el período de maduración se alarga considerablemente (hasta los 7-8 meses). La microfilaremia es transitoria y de baja intensidad en las infecciones experimentales, mientras que las infecciones naturales son amicrofilarémicas la mayoría de las veces (Venco & Vezzoni, 2001).

El hombre se infecta de la misma manera que los reservorios animales. No obstante, al no existir una completa adaptación parásito/hospedador, los vermes no completan, habitualmente, su desarrollo. En algunos casos alcanzan el estado de preadultos, los cuales pueden llegar a alojarse en una rama de la arteria pulmonar donde embolizan y producen un nódulo pulmonar. También se han observado ocasionalmente vermes adultos de *D. immitis* en diferentes zonas de la anatomía humana (Cordero et al., 1990). Dado que dichos vermes se encuentran aislados, no existe posibilidad de reproducción. No obstante, se han publicado casos humanos en los que se han detectado microfilarias en la sangre (Nozais et al., 1994; Petrocheilou et al., 1998). Nosotros hemos observado recientemente una serie de casos clínicos en los que las hembras de *D. repens* presentes en nódulos subcutáneos, contenían embriones en desarrollo en sus úteros (datos propios no publicados). Este hecho plantea la cuestión de si los casos de



dirofilariosis humana son amicrofilarémicas por no existir fecundación, o porque el sistema inmune desarrolla una respuesta que destruye los embriones o los propios vermes adultos.

2.2. La bacteria endosimbionte *Wolbachia*.

Como otras filarias, *D. immitis* alberga bacterias endosimbiontes del género *Wolbachia*. Las bacterias simbiotes de las filarias fueron descubiertas en los años 70 mediante el empleo de la microscopía electrónica (McLaren, 1975; Vincent et al., 1975; Kozek, 1977; Kozek & Figueroa, 1977). Estos autores relacionaron las bacterias con los simbiotes del género *Wolbachia* presentes en los insectos vectores (McLaren, 1975) sugiriendo, además, con una gran intuición, que podrían contribuir a la patogénesis de las filariosis (Kozek, 1977; Kozek & Figueroa, 1977). Dos décadas después, Sironi et al. (1995) reidentificaron *Wolbachia* en vermes adultos de *D. immitis* aplicando métodos de biología molecular. Actualmente, se considera que el género *Wolbachia* pertenece al orden Rickettsiales (α -2-Proteobacterias) que está muy relacionado con los géneros *Ehrlichia*, *Cowdria* y *Anaplasma* (O'Neill et al., 1992).

Wolbachia ha sido identificada en muchas especies de filarias, entre las que se encuentran la mayoría de las especies parásitas más importantes del hombre (*Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *Onchocerca volvulus*), así como en especies zoonóticas (*D. immitis* y *D. repens*) (Sironi et al., 1995; Bandi et al., 1998; Taylor et al., 1999; Henkle-Dührsen et al., 1998). Además, se ha demostrado su ausencia en *Acanthocheilonema vitae* y en *Onchocerca flexuosa* (Henkle-Dührsen et al., 1998), y existen evidencias de que tampoco se encuentra en *Loa loa* (McGarry et al., 2003).

Están presentes en todas las fases evolutivas de las filarias, siendo especialmente abundantes en las larvas que se desarrollan en los hospedadores vertebrados, en los cordones hipodérmicos de los adultos y en los órganos reproductores de las hembras (Fenn & Blaxter, 2004; Lamb et al., 2004). Las bacterias se encuentran aisladas, en pequeños grupos o en grupos numerosos que ocupan el citoplasma de las células afectadas. No se han observado evidencias de efectos patológicos en los nematodos, aunque McLaren et al. (1975) advirtieron que los embriones muy infectados parecían detener su desarrollo. Por otra parte, la administración de antibióticos (tetraciclinas) a los hospedadores con filariosis produce alteraciones en el desarrollo de los embriones



dentro del útero de las hembras, hecho que no se observa en filarias libres de simbiosis (Hoerauf et al., 1999; McCall et al., 1999). Estos datos parecen indicar que *Wolbachia* ha evolucionado hasta establecer una relación simbiótica obligatoria, que es crucial para la embriogénesis y la muda de las filarias que las albergan (Bandi et al., 2001). Sin embargo, en diferentes especies de artrópodos, adoptan un amplio repertorio de comportamientos, que van desde la asociación comensal hasta el parasitismo reproductivo, incluyendo la feminización de los machos, inducción de partenogénesis, daños en los tejidos y muerte de los hospedadores (Taylor & Hoerauf, 1999). Puesto que *Wolbachia* puede colonizar distintos tipos de células en diferentes hospedadores, ha surgido la duda de si son capaces de infectar al hombre. Estudios preliminares han demostrado la presencia del ADN de *Wolbachia* en la sangre de personas infectadas con *Brugia malayi* (Taylor & Hoerauf, 1999; Keiser et al., 2002), sin que se haya podido establecer si las bacterias endosimbiontes invaden células del hospedador humano.

3. Extensión de la dirofilariosis animal y humana.

3.1. Distribución de la dirofilariosis animal.

La dirofilariosis cardiopulmonar canina es una enfermedad cosmopolita. Existen numerosos países endémicos en zonas templadas, semitropicales y tropicales de todo el mundo. Las prevalencias en las poblaciones caninas varían entre el 0,24 y el 73% dependiendo de diversos factores. Se han realizado relativamente pocos estudios epidemiológicos sobre la dirofilariosis felina a nivel mundial, por lo que no se puede presentar aún un cuadro epidemiológico tan completo como el de la dirofilariosis canina (Genchi et al., 2001; McCall et al., 2008).

La dirofilariosis animal está presente en América del Norte, Central, y del Sur. En América del Norte, tanto Canadá como Estados Unidos tienen áreas endémicas. En Canadá, la prevalencia canina media observada es del 0,24% (Zimmerman et al., 1992; Klotins et al., 2000) aunque existen zonas con prevalencias superiores. En Estados Unidos, la dirofilariosis canina ha sido detectada en la mayoría de los estados (McCall et al., 2008). Los estados del norte son los que tienen las prevalencias más bajas como, por ejemplo, en Minesota, donde el 1,5% de los perros están infectados (Beall et al., 2008). Las prevalencias más elevadas se han observado en los estados de la costa



atlántica y en el valle del río Mississippi (48,8%) (Levi et al., 2007; Bowman et al., 2007). La dirofilariosis felina también está ampliamente distribuida en este país. Knight & Lok, (1995) encontraron gatos con infecciones ocultas y argumentaron que, en zonas endémicas de dirofilariosis canina, el porcentaje de gatos infectados ronda entre el 5 y 20% de la prevalencia canina. En Méjico, la prevalencia en perros oscila entre el 20 y el 42% a lo largo de la costa del golfo de Méjico (Guerrero et al., 1992; Labarthe & Guerrero, 2005).

En países como Cuba, Puerto Rico y República Dominicana existen también estudios que demuestran prevalencias entre el 3,1 y el 63,2% (Bouza & Dumenigo, 1985; Duran-Struuck et al., 2005).

En Sudamérica, la dirofilariosis es endémica en la mayoría de los países (Genchi et al., 2001; Larbate & Guerrero, 2005). Argentina y Brasil son claros ejemplos de ello. Allí se han denunciado prevalencias caninas del orden del 1,3 al 57,1% (Alves et al., 1999; Rosa et al., 2002; Araujo et al., 2003; Carlos et al., 2007), mientras que el porcentaje de gatos infectados es del 0,8%, en el área de Río de Janeiro (Brasil) (Labarthe et al., 1997). Otro ejemplo de endemismo es el de las islas Galápagos (Ecuador) donde el 34% de los perros están infectados (Levy et al., 2008).

En Australia, la dirofilariosis animal es endémica en las costas del norte, del oeste y en todo el sur (Lok, 1988; Copland et al., 1992) con prevalencias caninas del 11,4% (Bidgood & Collins, 1996). En gatos, un estudio detectó serología positiva de anticuerpos en 101 gatos de 207 analizados (Kendall et al., 1991).

En África, los estudios epidemiológicos son escasos, aunque se sabe que *D. immitis* está presente en diferentes regiones de este continente. En Egipto, Marruecos, Kenia, Mozambique, Angola, Tanzania, Nigeria y República de Sudán se han encontrado casos de dirofilariosis canina y en Sierra Leona, además, de dirofilariosis felina (Matola, 1991; Genchi et al., 2001; Schwan & Durand, 2002). En el sur del continente, la dirofilariosis no parece ser endémica ya que se han reportado muy pocos casos, solamente en perros. En Sudáfrica, por ejemplo, se han observado ocasionalmente perros positivos, pero eran importados (Genchi et al., 2001).

En Asia y la región del Pacífico, la detección de perros infectados con *D. immitis* es frecuente. Las prevalencias alcanzan valores muy altos en las zonas costeras y en las islas. Países como Corea, Japón, Tailandia, Irán, Malasia y Turquía son endémicos. Las



prevalencias más elevadas se han observado en Malasia (70%), Taiwán (53,8%) y Japón (59%) (Fujinami et al., 1983; Lok, 1988; Jafari et al., 1995; Ryan & Newcomb, 1995; Lee et al., 1996; Oge et al., 2003; Kim & Huh, 2005; Byeon et al., 2007; Niwetpathomwat et al., 2007; Yildirim et al., 2007; Simsek et al., 2008). En Japón, en la región de Kanto, el 2% de los gatos están infectados (Fujinami et al., 1983; Ryan & Newcomb, 1995) y, en las islas de Honshu y Kyushu, Roncalli et al., (1998) observaron entre el 0,5 y el 9,5% de los gatos callejeros y, entre el 3 y el 5,2% de los gatos que habitan solamente en casa están infectados.

En Europa existen numerosos estudios epidemiológicos sobre la dirofilariosis canina y felina. Es endémica en los países mediterráneos y del sur como Portugal, España, Francia e Italia (Genchi et al., 2005) (Figura 2).

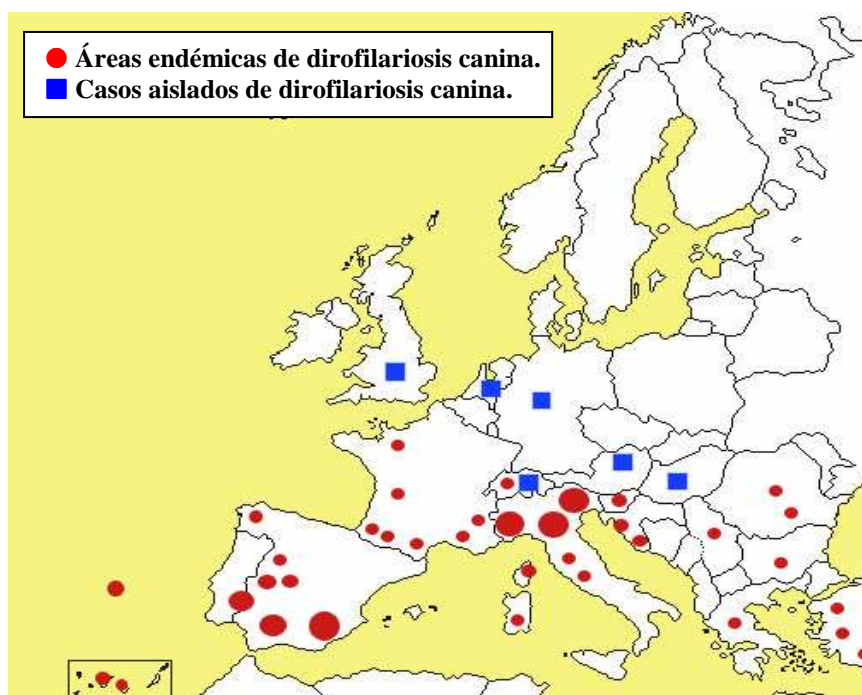
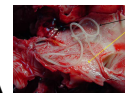


Figura 2. Distribución de la dirofilariosis cardiopulmonar canina en Europa.

En España, las islas Canarias y las provincias sur-occidentales de la Península Ibérica son las zonas en donde se han encontrado más casos de animales infectados (Montoya et al., 2007). En la isla de Gran Canaria, la prevalencia en perros alcanzó el

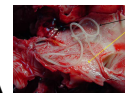


58,9% (Montoya et al., 1998) y actualmente se estima que el 18,3% de los gatos están infectados (Morchón et al., 2004). En Tenerife se ha detectado un descenso de la prevalencia canina desde el 41,8% (Valladares et al., 1987) hasta el 21% (Montoya et al., 2006). En la Península Ibérica las prevalencias oscilan entre el 5,6% (valle del río Ebro) y el 36,7% (Huelva) (Ortega-Mora et al., 1991; Aranda et al., 1998; Guerrero et al., 1995; Rodes, 2006; Solano-Gallego et al., 2006). El valle del río Tormes, en la provincia de Salamanca, constituye una zona endémica de dirofilariosis en la que Pérez Sánchez et al. (1989) encontraron parasitados el 33,3% de los perros muestreados. En Portugal, la dirofilariosis canina alcanza el 30% en la isla de Madeira, el 16,7% en Ribatejo, el 16,5% en el Alentejo y el 12% en el Algarve (Araujo, 1996; Genchi et al., 2001 y 2005).

En Francia las infecciones caninas se localizan principalmente en el sur del país y a lo largo de la costa mediterránea. La prevalencia en perros varía entre el 5 y el 15%. Está muy extendida en la isla de Córcega, Bocas del Ródano y Vaucluse, y es algo menor en el Alto Garona, Dordogne y en las regiones adyacentes a los Alpes. Por último, en Sommieres, Beaufils et al. (1991) identificaron microfilarias de *D. immitis* en la orina, y no en sangre, de un gato con evidencias radiológicas.

En Italia se encuentra el área endémica más extensa de Europa. Está situada a lo largo del valle del río Po, donde la prevalencia canina alcanza el 50-80% en algunos enclaves. Casi el 25% de los perros positivos presentaban infecciones ocultas. Tasas inferiores se observan en el centro del país, donde el área de mayor endemia se localiza en la Toscana (12,4%) (Genchi et al., 1993). En el sur, el 0,6% de los perros son microfilarémicos (Cringoli et al., 2001) y en Cerdeña y Puglia se registran prevalencias del 2 al 5%. Recientemente se ha determinado que la seroprevalencia felina en el norte de Italia oscila entre el 9 y el 27% (Genchi et al., 2001).

En Grecia, un estudio realizado por Polizopoulou et al. (2000) reveló que, de 91 perros positivos con dirofilariosis, 21 eran asintomáticos, 57 presentaban signos clínicos moderados y 13 poseían dirofilariosis grave. Además se demostró microfilaremia en 75 de un total de 85 perros infectados. En los países balcánicos, como Serbia y Croacia, la dirofilariosis canina se detectaba esporádicamente en el pasado pero, actualmente, se observa una incidencia creciente (6 y 47%, respectivamente) (Brglez & Senk, 1987; Dimitrijevic, 2007; Kirkova et al., 2007; Sofía et al., 2007). En Rumanía, el 35% de los



perros están infectados (Olteanu et al., 1996) y en Bulgaria el 12,5% (Georgieva et al., 2001).

Por último, en los países del centro y norte de Europa, como Austria, Suiza, Alemania, Reino Unido, Holanda, Suecia y Hungría, se detecta un número creciente de casos en perros importados o que han pasado algún tiempo en países endémicos del área mediterránea, América del Norte y Medio y Extremo Oriente (Meyer et al., 1994; Deplazes et al., 1995; Wohlsein et al., 1996; Voros et al., 2000; Jensen et al., 2003).

3.2. Cambios en el patrón de distribución de la dirofilariosis animal.

No es fácil individualizar los factores que determinan la difusión y los cambios en la epidemiología de la dirofilariosis. Los factores que generalmente se consideran más importantes son:

1. La presencia en un área dada de reservorios u hospedadores definitivos en los que *Dirofilaria* es capaz de desarrollarse y mantener un estado de microfilaremia indispensable para la transmisión del parásito.
2. Especies de vectores que pueden estar implicadas en la transmisión.
3. La existencia de unas condiciones ambientales adecuadas para la cría de los mosquitos vectores, lo que influye en la densidad de sus poblaciones.
4. En las zonas de baja prevalencia, la profilaxis tiende a ser fuertemente deficitaria y probablemente aplicada de forma incorrecta, lo que crea focos no controlados a partir de los cuales se puede difundir a zonas aledañas.
5. El fenómeno del *calentamiento global*, que parece estar sufriendo la tierra, también determina que el período de transmisión se prolongue en las áreas endémicas y que zonas consideradas no endémicas, entren en la categoría de riesgo.

Los ambientes más favorables para la difusión de la dirofilariosis se caracterizan por tener una elevada temperatura y humedad, condiciones idóneas para el desarrollo y la actividad de los mosquitos. Cuanto más amplio es el período en el que se dan estas condiciones climáticas, mayor es el riesgo de infección y de difusión de la enfermedad en la población animal. Otro factor importante es la ocupación humana del territorio, no sólo por el aumento de la densidad de hospedadores competentes, sino también porque



crea un ambiente favorable para el desarrollo de algunas especies de mosquitos, particularmente eficientes en la transmisión del parásito, como *Culex pipiens*. En los últimos años, la urbanización de las áreas rurales en la periferia de las ciudades, el hábito de tener perros como animales de compañía y de llevarlos durante los viajes de los propietarios, son otros factores fundamentales que han contribuido a la difusión de la enfermedad.

Dentro de los países endémicos europeos, se observa una expansión hacia el norte. En Italia, en los últimos 40 años, la dirofilariosis se ha ido extendiendo desde áreas hiperendémicas del valle de Po hasta los 800 metros de altura en los Apeninos y los Alpes. Los casos de dirofilariosis canina diagnosticados en Suiza se deben, en su mayoría, a infecciones contraídas en el exterior. Sin embargo, se han documentado casos probablemente autóctonos de *D. immitis* en el sur del país, lo que certifica que la parasitosis ha traspasado la barrera montañosa (Genchi et al., 1993 y 2001). Actualmente parecen existir dos focos separados en el territorio suizo. Uno, que ocupa la zona de Chiasso y Mendrisio, tiene evidente continuidad territorial con el área de Como y Varese (norte de Italia), que forma parte de la amplia zona endémica de la Llanura Padana. El segundo se encuentra en la zona de Locarno y no parece tener continuidad con otros focos, teniendo posiblemente su origen en la introducción de perros microfilarémicos procedentes de Italia (Genchi et al., 2001). Así mismo se han registrado prevalencias bajas pero significativas (3%), en el Cantón de Ticino. En Austria, entre 1999-2003 fueron diagnosticados 87 de 35.000 perros muestreados, todos ellos importados de países mediterráneos (Prosl et al., 2003). En Alemania se observó un 15% de perros con infección entre junio de 2002 y octubre de 2003. La mayoría de ellos eran perros jóvenes (entre 1 y 5 años) y provenían de la isla de Tenerife (España) (Geiger & Beelitz, 2003).

Las relaciones que el parásito establece con el vector tienen una gran influencia en la epidemiología de la dirofilariosis. Existe un aumento en la densidad de los mosquitos vectores debida a las modificaciones de la situación climático/ambiental. El género *Aedes* es un vector competente pero no resistente, por lo que una toma de sangre con una elevada concentración de microfilarias puede impedir su actividad y supervivencia. *Culex pipiens*, por el contrario, es competente y resistente. Tiene la capacidad de adaptarse a condiciones ambientales muy diferentes, incluso



contaminadas. Estas dos propiedades hacen de esta especie el vector más importante de la dirofilariosis en Italia. Otro fenómeno a considerar es la introducción de nuevas especies de mosquitos vectores en una región donde anteriormente no estaban presentes. Áreas en las que se produce sólo una ocasional introducción de perros infectados, pero en las que no existen vectores, pueden llegar a ser de riesgo cuando aparecen nuevas especies de mosquitos competentes. Se ha descrito una correlación significativa entre la introducción de *Aedes albopictus* (de origen asiático) en diversas áreas como el estado de Louisiana (EEUU) o Italia, y *Aedes sierrensis* (de origen californiano) en Utah (EEUU) y el aumento de la dirofilafiosis canina. Preocupa especialmente la capacidad vectorial de *Aedes albopictus*, recientemente introducido en Europa desde Oriente, por su intensa antropofilia (Cancrini et al., 1995).

El cambio relacionado con la modificación del territorio, junto con el cambio climático global, han contribuido a la expansión de las especies vectoras y al aumento de sus poblaciones. La existencia de otros reservorios, además del perro, también puede ser de particular importancia en áreas con baja densidad canina, como ocurre en Estados Unidos con el coyote, o en Australia con los zorros rojos, los cuales garantizan la supervivencia de las filarias y permiten introducirla o reintroducirla en la población canina.

3.3. Distribución de la dirofilariosis humana.

Actualmente se acepta que donde hay dirofilariosis canina existe dirofilariosis humana. Una revisión retrospectiva de la misma no ofrece una definición de la distribución real de la dirofilariosis humana, porque sólo proporciona información relacionada con áreas donde hay interés por los parásitos y/o buenas herramientas diagnósticas. Además, son mucho más numerosas las denuncias de casos de dirofilariosis subcutánea/ocular que de dirofilariosis pulmonar. De hecho, en el caso de la primera, es el propio paciente el que, frecuentemente, detecta la presencia del parásito o de los nódulos que produce. En cambio, la dirofilariosis pulmonar es mucho más difícil de detectar, debido tanto a su carácter asintomático, como a su localización en órganos internos.

Más interesante e informativo que el número exacto de casos publicados es determinar la evolución de la frecuencia con que son denunciados y las áreas donde



aparecen. Dicha frecuencia aumenta en paralelo con el incremento del interés por *Dirofilaria*. A nivel mundial, entre 1965, año en el cual se publicó el primer caso de dirofilariosis pulmonar, y 1989, se identificaron 165 casos pulmonares, la mayoría de ellos en Estados Unidos, Japón y Australia (Simón & Genchi, 2000). Sin embargo en los 18 años siguientes (1990-2008), se han denunciado, al menos, 137 casos en 16 países diferentes (Simón et al., 2005; Miyoshi et al., 2006). En Italia, Francia, Grecia y España se han encontrado muchos casos humanos durante estos años (Pampiglione & Rivasi, 2000; Simón et al., 2005) (Figura 3).

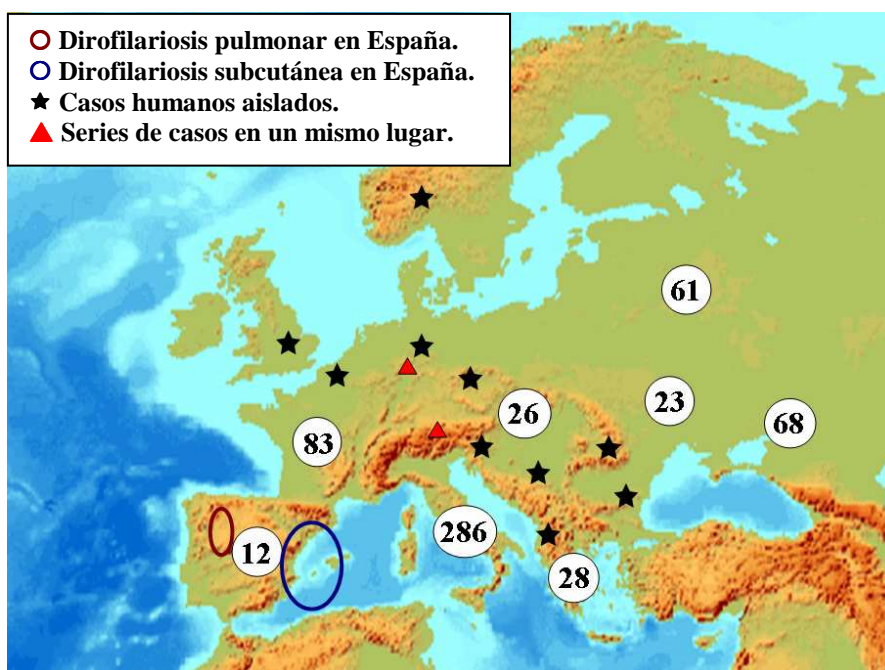


Figura 3. Distribución de la dirofilariosis humana en Europa.

En la Península Ibérica, todos los casos de dirofilariosis humana han sido identificados en España (12 casos), mientras que no existen denuncias en el territorio portugués. Hasta el momento, *D. immitis* es la única de las dos especies que se ha encontrado en las poblaciones caninas del Oeste de España, mientras que *D. repens* predomina en las poblaciones del este peninsular. Esta distribución no es homogénea, habiéndose detectado las prevalencias más altas en los valles de los ríos y en las zonas



húmedas, como áreas de regadío donde las condiciones son más favorables para la cría de los mosquitos (Simón et al., 2003a). La localización geográfica de los casos de dirofilariosis humana detectados hasta el momento coincide con la distribución de la dirofilariosis canina (Cordero et al., 1990 y 1992a y b). Los casos pulmonares se han descrito primordialmente en el oeste, mientras que los subcutáneos oculares se han denunciado en la costa mediterránea y las islas Baleares (Ruiz-Moreno et al., 1998; Simón et al., 2001).

En Francia se han denunciado al menos 83 casos humanos, muchos de ellos cerca de la costa Mediterránea y en Córcega (Raccur, 1999; Genchi et al., 2001; Abou-Bacar et al., 2007). Particularmente se considera la dirofilariosis humana como una enfermedad emergente en la costa Atlántica desde 1996 (Masseron et al., 1996; Guillot et al., 1998; Estran et al., 2007).

Italia es el país europeo donde se ha denunciado el mayor número de casos de dirofilariosis humana (286). De manera similar a lo que se ha observado en España, la localización geográfica de las dos especies en las poblaciones caninas presenta una distribución similar. *D. immitis* predomina ampliamente en las poblaciones caninas de la mitad norte del país, mientras que *D. repens* es más prevalente en las de la mitad sur. Sin embargo, casi todos los casos humanos diagnosticados han sido atribuidos a *D. repens*, incluso en las áreas donde *D. immitis* es mucho más prevalente (Simón et al., 2005; Rivasi et al., 2006).

En Grecia, la mayoría de los casos son de dirofilariosis subcutánea (28) y sólo se ha detectado un caso de dirofilariosis pulmonar (Pampiglione et al., 2000; Maltezos et al., 2002).

Un número reducido de casos se han informado en las diferentes republicas balcánicas y en Eslovaquia. En Hungría, el número de casos de dirofilariosis humana asciende a 26 (Elek et al., 2000; Pónyai et al., 2006; Kucsera et al., 2007; Szénási et al., 2008), en Ucrania a 23 y en Rusia a 61 (Dorofeev et al., 1997; Postnova et al., 1997; Avdiukhina et al., 2003; Bronshtein et al., 2003; Kramer et al., 2007). Un total de 68 casos, 66 subcutáneos y 2 pulmonares han sido detectados en la región de Rostov (Sur de Rusia) entre 1998 y 2004 (Kramer et al., 2007; Kartashev, comunicación personal).

En los países de Europa central y del norte, considerados no endémicos hasta el momento, se vienen detectando casos humanos con frecuencia creciente en los últimos



años. Se han detectado casos aislados en Bélgica, Reino Unido y Noruega (Muro et al., 1999). En Alemania fueron diagnosticados 8, 2 antes de 1993 y 6 (4 subcutáneos y 2 pulmonares) en 1996, en una única unidad hospitalaria (Jelinek et al., 1996). En Austria, entre 1981 y 2008, se han diagnosticado 20 casos de dirofilariosis subcutánea u ocular confirmados mediante serología en nuestro laboratorio (Auer et al., 1997; Auer comunicación personal). Muchos de estos se han atribuido a infecciones adquiridas durante viajes a zonas endémicas del sur de Europa u otros lugares. Sin embargo, algunos casos se observaron en pacientes que nunca habían viajado fuera de sus países.

3.4. Nuevos modelos de predicción de la dirofilariosis.

Utilizando variables tales como el inicio y el final de la actividad de los mosquitos, su longevidad y la temperatura ambiental respecto del umbral mínimo de desarrollo del parásito, Slocombe et al. (1989) creó un modelo de previsión del inicio y del final del período de transmisión de la dirofilariosis, que se muestra particularmente útil para fines prácticos de quimioprofilaxis en áreas endémicas, y para determinar el momento de aplicación de tests de diagnóstico. Recientemente, el Sistema de Información Geográfico (GIS) ha sido aplicado para identificar áreas de dirofilariosis potencialmente endémicas, épocas anuales de transmisión, la situación y previsión en una localidad muy determinada, etc (Genchi et al. 2005). Se basa en el empleo combinado de diversas informaciones como altitud, registros de temperatura, lugares endémicos y no endémicos, porcentajes de dirofilariosis en los diferentes hospedadores, etc. El GIS ha sido aplicado en Europa, donde los resultados más relevantes indican que la zona con el periodo potencial de transmisión más largo se encuentra en Murcia, del 21 de marzo al 11 de noviembre y, el más corto en el noroeste de Europa. Este es el primer mapa de riesgo que incluye a toda Europa y sugiere que el clima actual y los cambios que se están produciendo podrían permitir la propagación de la dirofilariosis a áreas libres de infección. Recientemente, Medlock et al. (2006) han empleado el GIS como modelo predictivo de la supervivencia y actividad potencial del vector *Aedes albopictus* a lo largo del Reino Unido. Según sus conclusiones, el vector podría ser activo durante 4 ó 5 meses, entre Mayo y Septiembre, en los alrededores de los centros urbanos, llegando hasta los puertos de la costa.



4. Patología de la dirofilariosis cardiopulmonar.

La dirofilariosis cardiopulmonar canina es una enfermedad grave y potencialmente fatal. Aunque su nombre sugiere una patología cardíaca, se la debe considerar como una enfermedad generalmente crónica y de evolución progresiva, muy compleja, inicialmente vascular y pulmonar, y que sólo en sus últimas fases afecta al corazón (Venco, 2007a) (Figura 4).

Los daños se atribuyen principalmente a los vermes adultos localizados en la red arterial pulmonar, ventrículo derecho y grandes vasos adyacentes (vena craneal y vena cava caudal). Ocasionalmente aparecen también en localizaciones ectópicas como el cerebro, el ojo y la aorta. Las microfilarias parecen jugar un papel relativamente menor, aunque son responsables directas de pneumonitis y glomerulonefritis (Venco & Vezzoni, 2001) y su muerte masiva puede producir shock sistémico (Kitoh et al., 1994), que se relaciona con reacciones de tipo anafiláctico (Henry & Dillon, 1994). La dirofilariosis tiene un componente inflamatorio muy importante. Estudios previos realizados por nuestro grupo indican que los hospedadores infectados o inmunizados con *D. immitis* desarrollan una respuesta inmune dual Th₁/Th₂ (Marcos-Atxutegi et al., 2003; Kramer et al., 2005). La respuesta de tipo Th₁ proinflamatoria es estimulada por *Wolbachia* y la tipo Th₂ antiinflamatoria por los antígenos de *D. immitis* (Marcos-Atxutegi et al., 2003; Morchón et al., 2007b y c). En las infecciones caninas, las microfilarias parecen estar implicadas en el estímulo de la respuesta Th₂ mientras que, en las infecciones ocultas y en las humanas (que son siempre amicrofilarémicas), hay una respuesta Th₁ contra *Wolbachia* (Simón et al., 2005; Morchón et al., 2007c). Otros autores han demostrado que los macrófagos y los neutrófilos son células clave en la respuesta inflamatoria contra las filarias (Brattig et al., 2000 y 2001). *Wolbachia* estimula la quimiotaxis de los neutrófilos (Bazzocchi et al., 2003) e inhibe su apoptosis, prolongando así el estímulo inflamatorio (Bazzocchi et al., 2007). Se sabe que algunas moléculas, como la molécula dominante de la cubierta de *Wolbachia* en su forma recombinante (WSP_r), interaccionan con el receptor *Toll-like* (TLR) 2 y en menor medida con el TLR4 (Brattig et al., 2004), los mismos con los que reacciona el lipopolisacárido (LPS), si bien *Wolbachia* carece de LPS (Wu et al., 2004).

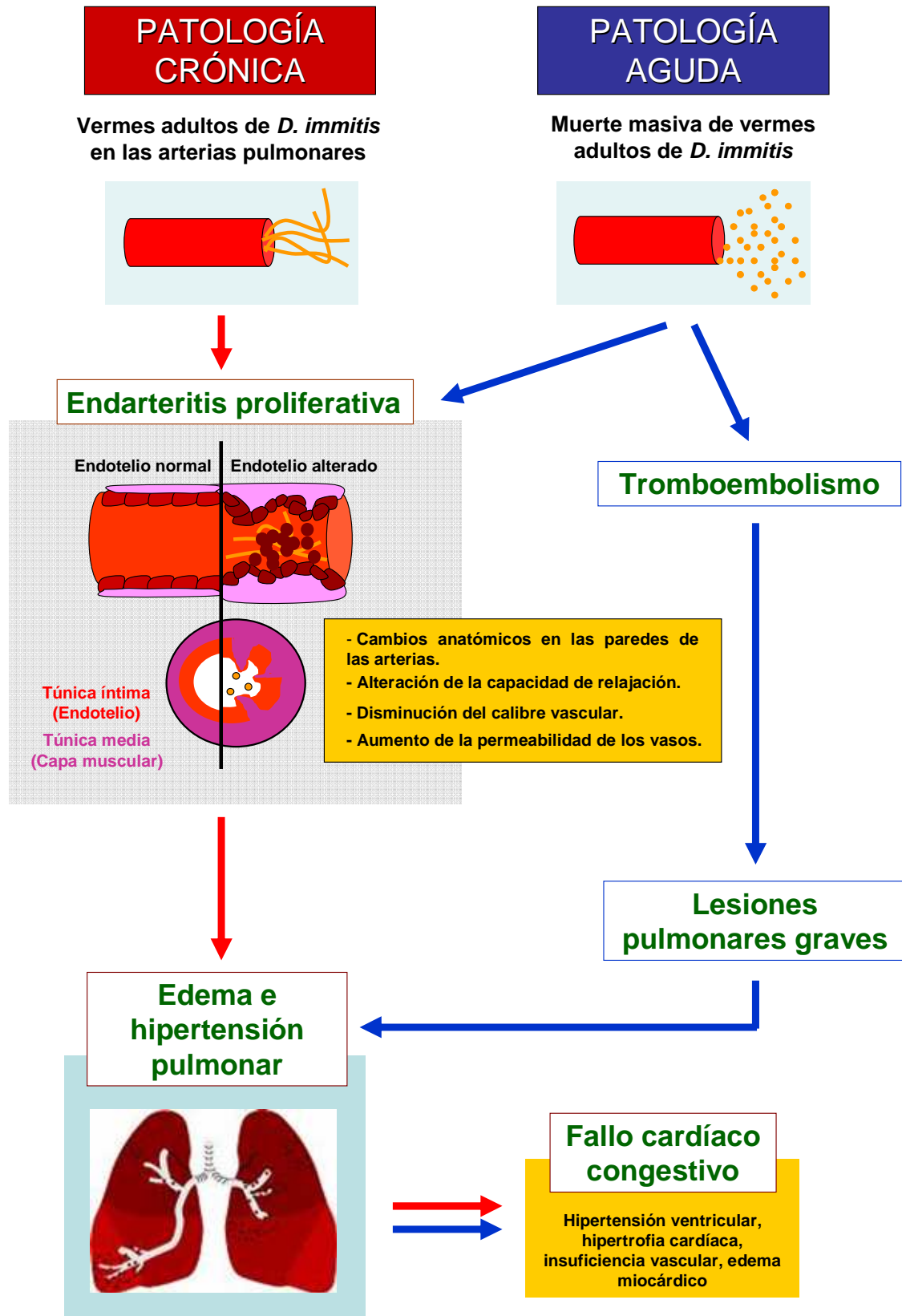
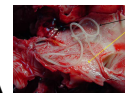


Figura 4. Cuadro general de la progresión de la patología de la dirofilariosis cardiopulmonar.



4.1. Daños vasculares.

La llegada de los vermes adultos a las arterias pulmonares produce alteraciones inmediatas en los vasos afectados. Los daños que se producen en esta primera fase son claves para el desarrollo posterior de la patología. Las alteraciones consisten principalmente en:

- ✓ Cambios anatómicos en las paredes arteriales.
- ✓ Alteraciones en la capacidad de relajación de la pared arterial.
- ✓ Disminución del calibre.
- ✓ Aumento de la permeabilidad de la pared vascular.

Se atribuyen a la acción mecánica (movimiento) de los vermes, a sus productos excretados y a la actividad de células inmunitarias del hospedador. El endotelio se engruesa (inflamación) y se desorganiza, mientras que la lámina elástica media tiende a degenerar. Las plaquetas secretan sustancias activas que estimulan la proliferación del músculo liso perivascular que se introduce en el lumen, formando vellosidades intravasculares (endarteritis proliferativa) (Furlanello et al., 1998), un fenómeno de hiperplasia característico de la dirofilariosis cardiopulmonar (Figura 5). Otros dos mecanismos que contribuyen a la progresión de la endarteritis son, en primer lugar, las reacciones antígeno-anticuerpo que activan el complemento, alterando la función endotelial y aumentando la permeabilidad vascular, y, en segundo lugar, el aumento de la lipoproteína de baja densidad (LDL) en el plasma, lo que contribuye a estimular la proliferación de las células del músculo liso hacia la íntima. Además, se produce fibrosis por la deposición de colágeno intersticial. Por otra parte, los vermes adultos de *D. immitis* liberan productos activos que alteran la capacidad de relajación de la pared de las arterias pulmonares (Kaiser et al., 1989; Mupanomunda et al., 1997). Estos procesos determinan disminución del calibre y pérdida de elasticidad de los vasos, lo que les impide adaptarse a la mayor demanda de sangre que aparece durante el ejercicio físico, y produce aumento de la presión arterial (hipertensión pulmonar) (Rohn et al., 1995; Venco & Vezzoni, 2001).

Por otra parte, la presencia física de los vermes produce alteraciones hemodinámicas de extrema gravedad. Aunque aún no están perfectamente definidos sus mecanismos, parece claro que la causa es la localización de numerosos vermes adultos



en el atrio ventricular derecho. Las turbulencias que aparecen en el torrente sanguíneo inducen daños mecánicos sobre la pared de los eritrocitos, que rápidamente se hemolizan. Por último, la masa de parásitos, oponiéndose al retorno venoso hacia el corazón, repercute fuertemente en el circuito sistémico, conduciendo a un estado de shock cardiocirculatorio de los sujetos afectados. Por todo ello, actualmente se tiende a emplear el término hemoglobinuria por dirofilariosis para denominar este proceso patológico, que es conocido como síndrome de vena cava (Kitagawa et al., 1987; Furlanello et al., 1998).

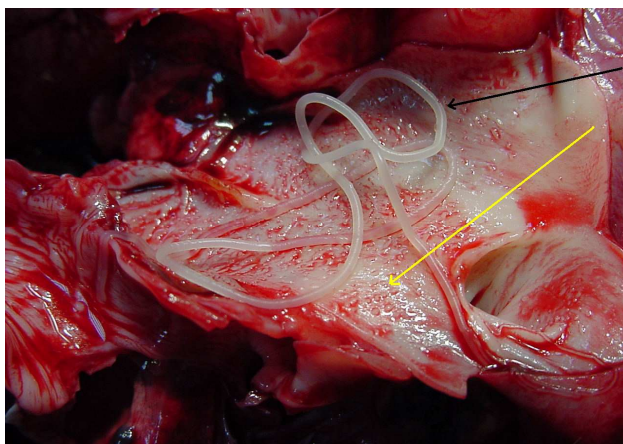


Figura 5. Endarteritis proliferativa (aspecto necroscópico). Imagen tomada por L. Venco (Clínica Veterinaria Città di Pavia, Pavía, Italia).

4.2. Daños pulmonares.

La disminución del calibre de los vasos, la pérdida de elasticidad de sus paredes, las obstrucciones que alteran el flujo sanguíneo y el aumento de presión intravascular, tienen como consecuencia la salida de líquido de los vasos al parénquima pulmonar perivascular, causando edema pulmonar (Venco & Vezzoni, 2001) (Figura 6). Además se ha descrito la aparición de fibrosis pulmonar, enfisema e hipertrofia de la musculatura bronquial. Los daños pulmonares a nivel vascular y perivascular se intensifican con el tratamiento adulticida, apareciendo infiltración de células inflamatorias y reacciones de hipersensibilidad tipo III. Los trombos y las obstrucciones vasculares determinan la aparición de isquemia regional. Recientemente se ha asociado



la muerte de los vermes, causada por tratamiento farmacológico, a graves lesiones alveolares, fibrosis y reducción del intercambio gaseoso (Venco, 2007a).

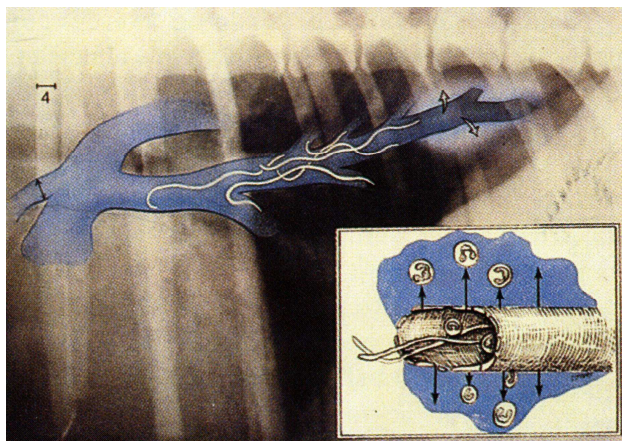


Figura 6. Edema pulmonar alrededor de una arteria pulmonar caudal. Imagen tomada de Furlanello et al. (1998).

4.3. Daños cardiacos.

El estado de hipertensión pulmonar conduce inicialmente a una dilatación del ventrículo derecho, acompañada de hipertrofia compensatoria. La persistencia de la hipertensión pulmonar, agravada en ocasiones por el aumento del ritmo cardiaco como consecuencia de la actividad física y de fenómenos tromboembólicos, determina una dilatación irreversible de toda la parte derecha del corazón que causa insuficiencia cardiaca congestiva (Figura 7).

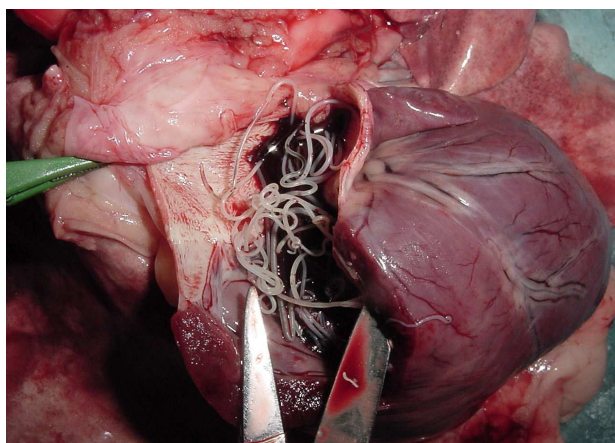


Figura 7. Vermes preadultos y adultos de *D. immitis* en el ventrículo derecho del corazón. Imagen tomada por L. Venco (Clínica Veterinaria Città di Pavia, Pavía, Italia).

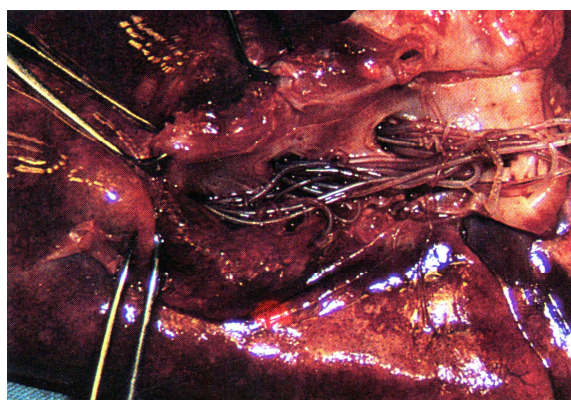


El miocardio se ve afectado por edema, fibrosis e isquemia que agravan la situación. También se produce insuficiencia valvular como consecuencia del agrandamiento de las cámaras atrio-ventriculares, o por la presencia de vermes en el interior del corazón (Venco & Vezzoni, 2001; Venco, 2007a). Todos estos procesos determinan la aparición de un estado congestivo que afecta primariamente el hígado y el riñón.

4.4. Patología aguda.

Paralelamente al desarrollo crónico y previsible descrito hasta aquí, pueden producirse procesos agudos que suponen un riesgo inmediato para la vida de los animales que los padecen (Venco, 2007a). Aparecen cuando se produce la muerte súbita y simultánea de muchos vermes adultos, de manera natural o como consecuencia de un tratamiento filaricida. La liberación masiva de productos antigénicos de los parásitos al torrente circulatorio es responsable de la exacerbación de las reacciones inflamatorias en el endotelio vascular (endarteritis) y de la formación de tromboembolismos importantes (Venco & Vezzoni, 2001) (Figura 8). Estos procesos ocurren en los perros, pero revisten especial gravedad en los gatos, ya que puede causar edema pulmonar y fallo respiratorio, que pueden acabar con la vida de los sujetos afectados (Furlanello et al., 1998).

Figura 8. Tromboembolismo localizado en la arteria pulmonar caudal. Imagen tomada de Furlanello et al. (1998).





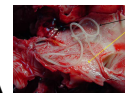
4.5. Sintomatología.

En el perro, durante cierto tiempo (variable) no se manifiestan síntomas. El daño en las arterias es mayor cuanto mayor es el ejercicio físico. Los síntomas, que van apareciendo progresivamente son tos crónica, disnea, lipotimias después del ejercicio, debilidad, anorexia, pérdida de peso y deshidratación. Aparecen sonidos pulmonares en los lóbulos caudales, arritmias y ruidos cardíacos por insuficiencia de la tricúspide. El abdomen y las patas sufren hinchazón por acumulación de líquidos cuando hay fallo congestivo. Después de los embolismos graves aparecen síntomas tales como disnea aguda y hemoptisis. No suele haber muerte súbita.

A veces se presentan casos de una variante clínica con desarrollo agudo denominado síndrome de vena cava (Venco, 1993; Furlanello et al., 1998). Se presenta de improviso, con hemólisis intravascular, anemia, hemoglobinuria y shock cardiocirculatorio (Tamashiro et al. 1987). El pronóstico generalmente es desfavorable. Este síndrome se señala en la literatura en zonas de elevada endemia, durante el período primavera/verano y sobre todo en perros jóvenes de 3 a 5 años. Hay estudios que sugieren la existencia de factores predisponentes en los machos y protectores en las hembras (Furlanello et al., 1998).

4.6. Dirofilariosis felina.

En los gatos, el desarrollo de la enfermedad presenta rasgos diferentes respecto de los descritos en los perros. En bastantes casos no aparecen síntomas y se produce una curación espontánea. Por otra parte, los casos agudos no son infrecuentes y la evolución de la patología no es previsible. Síntomas tales como vómitos, hemoptisis y diarrea pueden aparecer de manera imprevista y la muerte sobreviene a las pocas horas de la aparición de los síntomas (Venco, 2007b). Las alteraciones neuronales y pulmonares son gravísimas (Calvert et al., 1994). Las lesiones en los vasos pulmonares son frecuentes y están muy extendidas ya que la reactividad del endotelio es muy marcada, a pesar del escaso número de parásitos que habitualmente producen la infección (Atkins et al., 1995). En los vasos pequeños y medianos se produce, principalmente, una alteración en el endotelio (Furlanello et al., 1998; McCall et al., 1994) mientras que en los vasos de mayor diámetro, hay una proliferación de tipo muscular. La participación



de los eosinófilos es muy común en estos casos. Son frecuentes las obstrucciones arteriales, que provocan malformaciones, y trombos, ya estén los parásitos vivos o muertos (McCall et al., 1994). Es poco frecuente que se desarrolle una hipertensión pulmonar que cause hipertrofia ventricular derecha. Aún cuando se producen tromboembolismos por la muerte de los parásitos, la circulación colateral es suficiente para prevenir infartos pulmonares (Atkins et al., 1995). La respuesta inmunitaria es fuerte. Los fenómenos inmunopatológicos, como la hipersensibilidad, contribuyen de manera determinante a la formación del cuadro clínico y al transcurso de la enfermedad.

4.7. **Dirofilariosis humana.**

La dirofilariosis pulmonar humana se produce por la destrucción de uno o varios vermes alojados en una arteria pulmonar. En el humano, la lesión más característica que se produce es la de un nódulo solitario pulmonar que se revela mediante la exploración radiológica, aunque a veces se han localizado múltiples lesiones nodulares. Tienden a situarse periféricamente, estando muchos de ellos en localización subpleural, que es donde se sitúan las arteriolas pulmonares periféricas que tienen un diámetro similar al de los vermes. Sus características radiológicas sugieren que son nódulos de tipo benigno, con forma circular u ovalada y con densidad homogénea. Muchos de los nódulos pulmonares parecen ser transitorios y, en algunos casos, aparecen lesiones residuales con forma de pequeños nódulos calcificados (Cordero et al., 1992b). La mayoría de los individuos con dirofilariosis pulmonar son asintomáticos, y los nódulos solitarios pulmonares se detectan casualmente al realizar una radiografía torácica por sospecha de una enfermedad de distinta naturaleza. Algunas veces aparece sintomatología. Ésta suele ser inespecífica y está constituida por distintas combinaciones de tos, dolor pleurítico, no pleurítico, expectoración purulenta, esputos hemoptóicos, fiebre y otros síntomas. Un hecho de importancia y cuyo origen se desconoce, es porqué sólo una pequeña parte de los individuos infectados con *D. immitis* desarrollan nódulos (Simón & Genchi, 2000). Una de las razones podría ser la destrucción de las L₃ en el tejido subcutáneo o de las L₄ en emigración, en una gran mayoría de las infecciones. En la actualidad se está valorando el posible papel de *Wolbachia* en este hecho (Simón et al., 2005; Simón et al., 2007)



5. El endotelio vascular.

El endotelio vascular es el tejido que primariamente recibe la influencia de los productos liberados por los parásitos. Por ello se revisan a continuación las propiedades de las células endoteliales vasculares y las moléculas que producen. La acción de diversos estimuladores (como los antígenos de *D. immitis* y *Wolbachia*), puede inducir modificaciones en dichas células y sus moléculas, relacionadas con procesos como la inflamación y la permeabilidad, de gran importancia en la dirofilariosis cardiopulmonar.

El endotelio vascular es una superficie lisa formada por una monocapa de células endoteliales que actúa como barrera semipermeable entre el interior de los vasos sanguíneos (arterias, capilares y venas) y los tejidos circundantes (Figura 9).

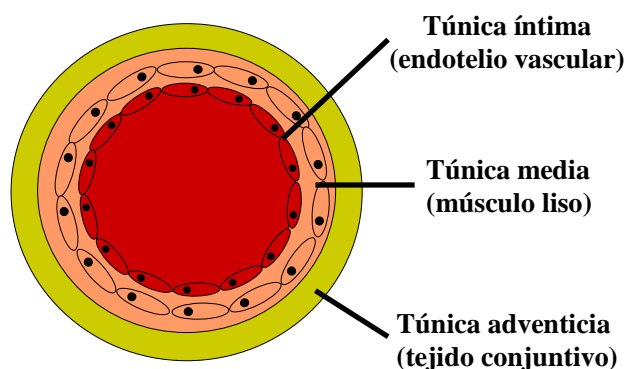


Figura 9. Localización del endotelio vascular en los vasos sanguíneos

Las células endoteliales que conforman el endotelio vascular forman parte de la túnica íntima, la capa más interna de las tres existentes en la pared de los vasos sanguíneos, junto a la túnica media y a la túnica adventicia. Bajo el endotelio vascular está la lámina basal que sirve de anclaje para las células endoteliales y la capa limitante interna, formada exclusivamente por fibras de elastina, que es la que confiere a los vasos sanguíneos elasticidad y capacidad para dilatarse y contraerse.



Dichas células tienen múltiples funciones (Dejana et al., 2001 y 2004):

- ✓ Facilitan el flujo laminar de la sangre.
- ✓ Regulan la angiogénesis, el remodelado vascular y el intercambio de nutrientes entre la sangre y los tejidos.
- ✓ Participan en la respuesta inmune e inflamatoria, en la agregación plaquetaria, la coagulación, la fibrinólisis y la proliferación y contracción del músculo liso vascular en respuesta a un daño vascular.
- ✓ Producen distintas sustancias con efectos autoreguladores de la capacidad de los vasos (vasodilatadores y vasoconstrictores).

5.1. Mediadores moleculares producidos por el endotelio vascular en relación con la inflamación.

En relación con los estudios realizados, revisamos a continuación algunas de las moléculas sintetizadas por las células endoteliales vasculares, que median en la respuesta inflamatoria, como son los eicosanoides, las moléculas de adhesión que se encuentran en la superficie de las células, el óxido nítrico (NO) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

5.1.1. Eicosanoides. Aspectos generales.

Los eicosanoides son mediadores lipídicos vasoactivos e inmunomoduladores, derivados de ácidos grasos poliinsaturados de 20 carbonos, procedentes de la membrana lipídica de las células animales (Figura 10). Se sintetizan rápidamente, como respuesta a un estímulo externo, y actúan de forma autocrina o paracrina sobre células adyacentes y de forma esporádica como hormonas circulantes. Pierden rápidamente su funcionalidad y no se almacenan en el organismo. Son muy susceptibles a hidrólisis espontánea y a la conversión en metabolitos inactivos (Gough et al., 2002). Participan en un amplio espectro de acciones biológicas, como por ejemplo, la regulación de procesos fisiológicos y la modulación de la respuesta inmune e inflamatoria (Needleman et al., 1986; Brattig et al., 2006).

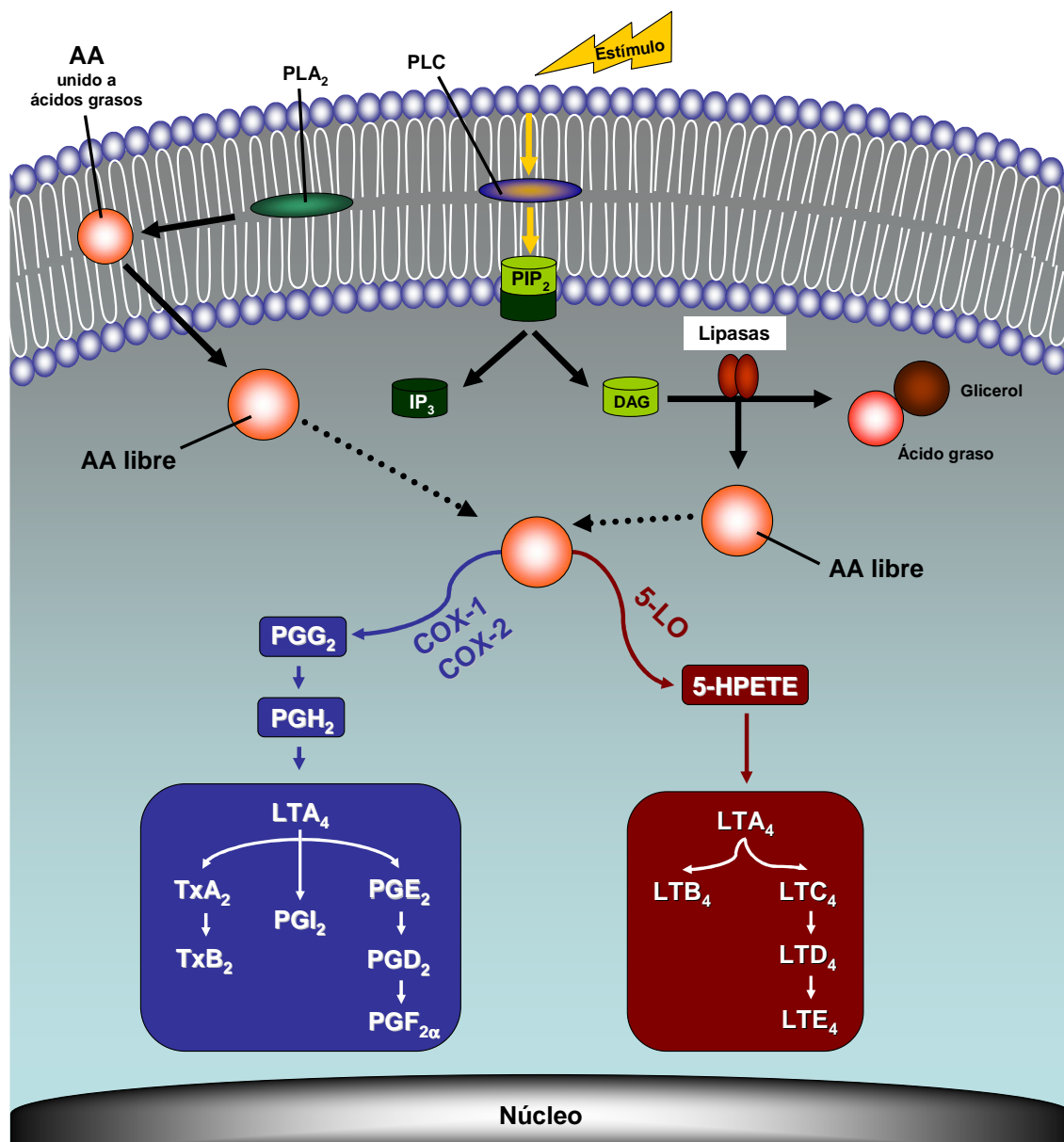


Figura 10. Metabolismo del ácido araquidónico en el citosol de una célula animal. Fosfolipasa C (PLC); fosfolipasa A₂ (PLA₂); ácido araquidónico (AA); fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂); inositol 3-fosfato (IP₃); diacilglicerol (DAG); ciclooxigenasa-1 (COX-1); ciclooxigenasa-2 (COX-2); 5-lipooxigenasa (5-LO); prostaglandina (PG); tromboxano (Tx); 5-hidroperoxieicosatetraenoico (5-HPETE); leucotrieno (LT).

Se dividen principalmente en prostaglandinas (PGs), tromboxanos (Txs) y leucotrienos (LTs). Las PGs y los Txs proceden de la ruta de las ciclooxigenasas (COXs) y los LTs de la ruta de las lipooxigenasas (LOs). Existe otra clase de compuestos, además de los que se consideran aquí, como son los ácidos



epoxieicosatetranoicos (EETs) y los ácidos hidroxeicosatetranoicos (HETEs). Son producidos por la citocromo *P450* monooxigenasa y pueden tener las mismas funciones.

El ácido araquidónico (AA) es la fuente principal para que se produzca la síntesis de las diferentes clases de eicosanoides. Se sintetiza a partir de ácidos grasos esenciales ingeridos a través de la dieta y se encuentra esterificado en la bicapa lipídica de las membranas celulares, en su mayor parte, en forma de fosfolípidos, glicerolípidos y lípidos neutros. Las membranas del retículo endoplasmático y del núcleo son los principales reservorios de AA. Sólo, una pequeña parte del AA se encuentra en forma libre. Por una serie de estímulos externos, ya sean químicos (hormonas o neurotransmisores), físicos (calor, corriente eléctrica) u otros, sobre las membranas celulares, se activa la síntesis de eicosanoides (Bogatcheva et al., 2005).

Podemos considerar que la biosíntesis de eicosanoides se produce en tres fases diferentes: 1) liberación del AA a partir de fosfolípidos de la membrana celular, 2) oxigenación del AA para producir PGH_2 , y 3) síntesis de PGs, Txs y/o LTs en función de las enzimas existentes en la células en ese momento.

La liberación del AA se produce principalmente por activación específica de la fosfolipasa A_2 (PLA_2) o por la acción de la fosfolipasa C (PLC), que actúa sobre el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2), dando diacilglicerol (DAG), que por su rotura espontánea origina AA libre. Parece ser que, en las células endoteliales, la PLA_2 citosólica abarca un grupo de enzimas esenciales en la síntesis de AA que se expresan de forma constitutiva en la mayoría de células y tejidos (Bogatcheva et al., 2005).

El AA se transforma en PGG_2 por acción de las COXs y posteriormente en PGH_2 mediante la acción de la PGH_2 sintetasa (Clària & Romano et al., 2005; Fitzgerland, 2003; Smith et al., 2000). Después, una serie de sintasas e isomerasas específicas convierten a la PGH_2 en diferentes eicosanoides. Las ciclooxigenasas -1 y -2 (COX-1 y COX-2) son responsables de la producción de PGs como, por ejemplo, PGD_2 , PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ y PGI_2 , y de Txs, como el TxA_2 , que es muy inestable y se transforma rápidamente en TxB_2 . La expresión de COX-1 y COX-2 se incrementa como respuesta al estrés, a la hipoxia, a la trombina, al LPS, a la producción de $\text{TNF-}\alpha$ y de algunas citoquinas y a diversos factores de crecimiento. Como respuesta tardía al estímulo también se puede producir PGJ_2 . Plaquetas, mastocitos, monocitos y macrófagos son capaces de sintetizar, también, PGD_2 , PGE_2 , PGF_2 y TxA_2 (Bogatcheva



et al., 2005). Por otro lado, y al igual que los productos derivados de las COXs, el AA puede ser transformado en 5-hidroperoxieicosatetraenoico (5-HPETE) por la acción de las LOs. En concreto, en células endoteliales, participan la 5-, 12- y 15-LO y en células endoteliales pulmonares, principalmente, la 5-LO (Bogatcheva et al., 2005; Clària & Romano et al., 2005). La 5-LO cataliza dos reacciones consecutivas, la síntesis de ácido 5(S)-hidroperoxieicosatetraenoico (5-EET) y la producción de LTA_4 , que es la más importante. El LTA_4 es muy inestable y se hidroliza rápidamente formando LTB_4 y LTC_4 . El LTC_4 puede ser transformado en LTD_4 y LTE_4 (Radmark, 2002; Peters-Golden & Brosk, 2001).

Los primeros efectos de los eicosanoides son experimentados por las propias células endoteliales y por las células del músculo liso que recubren la vasculatura, el tracto gastrointestinal, respiratorio y reproductor. Participan directamente en la regulación plaquetaria y en la migración de leucocitos hacia el foco de inflamación. Además, juegan un papel muy importante a nivel del sistema nervioso. El principal papel biológico de algunos de los eicosanoides sintetizados por las células endoteliales son (Tabla 2):

PROSTAGLANDINAS (PGs)	
PGD_2	Inhibe la agregación plaquetaria, es un débil vasodilatador e incrementa los niveles de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) (Schratl et al., 2007).
PGE_2	Promueve la migración y vasodilatación de las células endoteliales y controla la permeabilidad endotelial pulmonar (Bogatcheva et al., 2005; Birukova et al., 2007), estimula la respuesta Th_2 activando la síntesis de IL-4 e IL-10 (Betz & Fox, 1991) e inhibe la acción de los granulocitos y los monocitos. Es un antagonista del TxB_2 y tiene efectos inmunosupresores y antiinflamatorios (Liu & Weller, 1990).
$\text{PGF}_{2\alpha}$	Actúa como vasoconstrictor de arterias y venas (Gough et al., 2002).
PGI_2	Causa vasodilatación, inhibe la agregación y la mitogénesis plaquetaria, suprime la proliferación de células musculares e inhibe la adhesión de leucocitos. Las células del endotelio vascular son ricas en la enzima prostaciclina sintetasa (Gough et al., 2002; Kajita et al., 2005; Kawka et al., 2007). Además, es un antagonista del TxA_2 .



TROMBOXANOS (TxS)	
TxA₂	Activa la vasoconstricción, la agregación plaquetaria y la mitogénesis, incrementa la broncoconstricción en el parénquima pulmonar e incrementa la permeabilidad vascular como posible vía a la reconstrucción del citoesqueleto endotelial, estimula la proliferación de células musculares y es un quimioattractante de neutrófilos (Gough et al., 2002; Kajita et al., 2005; Kawka et al., 2007). También es producido por las plaquetas.
TxB₂	Activa la agregación plaquetaria y la vasoconstricción. Se encuentra en pacientes con shock séptico (Ball et al., 1986; Haurand & Ullrich, 1985).

LEUCOTRIENOS (LTs)	
LTB₄	Estimula la quimiotaxis (atracción de granulocitos, neutrófilos y eosinófilos) y contribuye a la extravasación del plasma y al edema tisular por incremento de la permeabilidad vascular. También lo producen los neutrófilos y eosinófilos. La inhibición del LTB ₄ en células endoteliales de la arteria pulmonar bloquea la trans migración de monocitos y neutrófilos (Bray et al., 1981a y b; Sala & Folco, 2001; Gough et al., 2002; Bogatcheva et al., 2005; Cook-Mills & Deem, 2005).
LTC₄ LTD₄ LTE₄	Estimulan la contracción del músculo liso en bronquios humanos. El LTE ₄ es también un broncoconstrictor pero su efecto es menos potente (Gough et al., 2002).

Tabla 2. Funciones biológicas de los eicosanoides.

5.1.2. Los eicosanoides en las filarias y otros helmintos parásitos.

Existen muy pocos datos sobre la síntesis y actividad de los eicosanoides en las filarias, casi todos ellos en relación con las filarias tropicales humanas. Las filarias no son capaces de sintetizar *de novo* ácidos grasos poliinsaturados, pero sí pueden incorporarlos del hospedador y metabolizarlos para producir diferentes tipos de eicosanoides. Las microfilarias de *Brugia malayi* tienen una gran afinidad por el AA exógeno, al que esterifican rápidamente en forma de fosfatidilinositol y fosfatidilcolina. Además del AA, pueden incorporar ácidos grasos saturados como el ácido oleico y/o palmítico que, aunque no son precursores de eicosanoides, también son incorporados en otra clase de fosfolípidos (Longworth et al., 1985 y 1987; Liu & Weller, 1990). Al



mismo tiempo, estas microfilarias también tienen grandes reservas de ácido oleico y de otros ácidos grasos poliinsaturados, pudiendo convertirlos en AA (Liu & Weller, 1989). Las microfilarias de *Brugia malayi* son capaces de producir prostaciclina y PGE₂ y pequeñas cantidades de PGD₂, además de PGF_{2α} y TxB₂. Se ha demostrado que inhiben la agregación plaquetaria por la acción de las prostaciclina y la PGE₂, a la vez que favorecen la vasodilatación, hechos que contribuyen a la supervivencia del parásito. Las PGs, al igual que sucede en las células de sus hospedadores, no son almacenadas en las microfilarias y se liberan rápidamente al torrente circulatorio para que actúen rápidamente sobre las células adyacentes después de su formación (Liu et al., 1990).

Los vermes adultos de *Brugia malayi* y de *Wuchereria bancrofti* también incorporan AA exógeno y sintetizan PGE₂ (Longworth et al., 1985; Liu & Weller, 1989; Liu et al., 1990; Liu et al., 1992). Por otra parte, se ha demostrado que, en *Brugia malayi*, el AA exógeno es necesario para la muda de L₃ a L₄. También se ha probado que inhibidores de la ruta de las LOs pueden bloquear dicha muda (Smith & Rajan, 2001). Otros trabajos demuestran la participación de la glutatión S-transferasa en la producción de PGD₂ en *Onchocerca volvulus* (Sommer et al., 2003) y de LTC₄ en *D. immitis* (Belley & Chadee, 1995). Recientemente se ha demostrado que las microfilarias y los vermes adultos de *Onchocerca volvulus* también son capaces de producir PGE₂, la cual ha sido implicada en la supervivencia del parásito (Brattig et al., 2006). Por último, Tarish & Atwell, (1993) han observado que la inhibición de prostaglandinas en perros infectados por *D. immitis* disminuye las lesiones pulmonares tras la muerte inducida de los vermes del propio parásito.

La presencia de eicosanoides ha sido demostrada en otras especies de helmintos parásitos. La síntesis de PGE₂ ha sido observada en *Ascaridia galli* (Meyer et al., 1996). Las cercarias de *Schistosoma mansoni* sintetizan productos derivados de las COXs y de las LOs cuando son incubadas con bajas concentraciones de ácido linoleico. Tanto las cercarias como los vermes adultos de *Schistosoma mansoni* son capaces de producir PGs, LTs y HETEs. La producción de LTs y HETEs se correlaciona con la penetración de las cercarias, mientras que la producción de PGE₂ se asocia con el desarrollo de la esquistosómula (Fusco et al., 1986). Los vermes adultos son capaces de sintetizar PGE₂, LTB₄, LTC₄ y HETEs (Belley & Chadee, 1995; Ramaswamy et al., 2000), asociándose la PGE₂ con la migración de dichos vermes.



5.2. Moléculas de adhesión de las células endoteliales.

Aspectos generales.

Las moléculas de adhesión son glicoproteínas de transmembrana que se encuentran en la superficie de las células endoteliales e intervienen en el mantenimiento de la integridad de los vasos sanguíneos, en la regulación la permeabilidad endotelial, en el control del ingreso de mediadores y células inmunitarias a los focos de inflamación y en la unión de las células endoteliales con la matriz extracelular (Dejana et al., 2001; Muller et al., 2003; Dejana, 2004; Braunersreuther & Mach, 2006). Dependiendo de la función que realicen, las podemos encontrar en los márgenes laterales, en la zona apical o en la zona basal de la célula. En el caso específico del aparato cardiovascular, las interacciones adhesivas se vinculan tanto con su desarrollo y funcionamiento normal como con sus alteraciones patológicas (Jaitovich & Etcheverry, 2004). Las propiedades adhesivas del endotelio vascular son muy importantes para la defensa del hospedador frente a una infección, por lo que la adherencia a otras células se convierte en un proceso único, complejo y crucial para las respuestas inmunológicas innata y adaptativa (Gough et al., 2002; Yadav et al., 2003).

Existen tres tipos de uniones entre células endoteliales, que están principalmente involucradas en el mantenimiento de la integridad y en la regulación de la permeabilidad endotelial: las **uniones ocluyentes** (*tight junctions*) en las que participan las ocludinas, claudinas, JAMs y las cadherinas; las **uniones adherentes** (*adherent junctions*) formadas por cadherinas y la PECAM-1; y las **uniones de tipo gap** (*gap junctions*) formadas por conexinas. Además, las células endoteliales poseen unas estructuras, llamadas complejos adherentes, los cuales contienen algunos componentes de los desmosomas de las células epiteliales asociados a las cadherinas (Schmelz & Franke, 1993; van Kempen & Jongsma, 1999; Dejana, 2004; Keiper et al., 2005b).

Al mismo tiempo, durante el proceso inflamatorio, las células endoteliales son capaces de sintetizar una serie de señales que aumentan el flujo sanguíneo y ejercen un efecto quimiotáctico sobre las células inmunitarias y, a su vez, sintetizar una serie de moléculas de superficie que actúan como receptores de membrana que ayudan a que los leucocitos circulantes se adhieran al endotelio y lo atraviesen (Figura 11) (Pober et al., 2001; Jaitovich & Etcheverry, 2004; Cook-Mills & Deem, 2005).

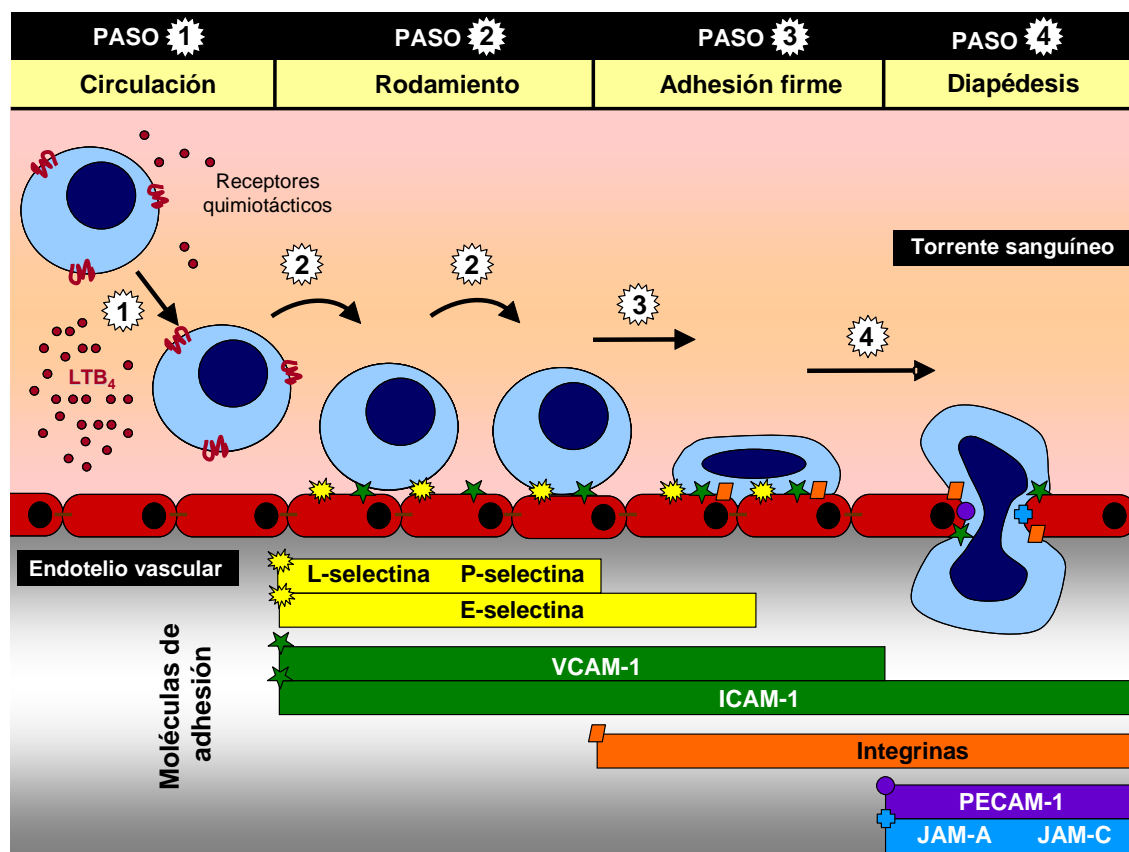
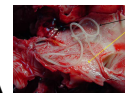


Figura 11. Funciones de las diferentes moléculas de adhesión en la migración de leucocitos a través del endotelio vascular.

En un primer momento, los leucocitos se unen débilmente al endotelio vascular, disminuyendo su velocidad de circulación, lo que permite que rueden sobre la superficie de las células endoteliales. Este proceso se denomina **rodamiento** (*rolling*) y en él participan algunas moléculas de adhesión como selectinas e inmunoglobulinas tipo C₂ (VCAM-1 e ICAM-1). Posteriormente, se adhieren firmemente al endotelio (**adhesión firme**) con la mediación de la VCAM-1, ICAM-1, conexina-37 y algunas integrinas. Finalmente, migran a través del endotelio, proceso denominado **diapédesis** o **transmigración** endotelial. Las células inmunitarias pueden migrar a través de las uniones intercelulares de células endoteliales (transmigración paracelular) o bien, a través del citoplasma de dichas células (migración transcelular). En la fase de diapédesis intervienen un gran número de moléculas de adhesión como son las JAM-A, JAM-C, ICAM-1, PECAM-1, conexina-43 y algunas integrinas (Muller et al., 2003; Yadav et al., 2003; Dejana, 2006; Braunersreuther & Mach, 2006). Los leucocitos se translocan



con la ayuda de pseudópodos; al mismo tiempo el citoesqueleto de las células endoteliales se desensambla rápidamente, empezando por la parte apical y reensamblándose según van pasando los leucocitos. En cultivos *in vitro* se ha demostrado que los neutrófilos completan este proceso en unos 90 segundos. La inhibición de la interacción entre las moléculas de adhesión y sus ligandos disminuye el proceso de migración de leucocitos (Braunersreuther & Mach, 2006; Hordijk, 2006).

Las moléculas de adhesión que intervienen en estos procesos están agrupadas en 5 grandes familias: inmunoglobulinas de tipo C, integrinas, selectinas, cadherinas y proteínas de la matriz extracelular estando, los 4 primeros grupos, muy relacionados con las enfermedades cardiovasculares. Por este motivo, a continuación describimos algunas de las moléculas más importantes que están dentro de estos grupos (Henao-Pérez & Montoya, 1999):

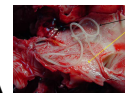
- **Inmunoglobulinas de tipo C:** ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1 y JAMs.
- **Integrinas:** Integrina $\beta 1$ - $\beta 8$.
- **Selectinas:** L-selectina, E-selectina y P-selectina.
- **Cadherinas:** E-cadherina y VE-cadherina.

Las uniones entre moléculas de adhesión de dos células pueden ser homofílicas (aquellas que se unen específicamente a otras moléculas de adhesión idénticas a ellas mismas) o heterofílicas (aquellas que lo hacen con otros receptores o con moléculas de adhesión diferentes). Si dos moléculas de adhesión de la misma célula se unen, la unión se denomina homotípica y si pertenecen a células diferentes se denominan heterotípicas (Chothia & Jones, 1997).

5.2.1. Inmunoglobulinas de tipo C.

Esta superfamilia comprende aquellas proteínas que tienen uno o más dominios extracelulares homólogos a las inmunoglobulinas. Se dividen en:

- Tipo C₁: involucradas en el reconocimiento de los antígenos. Se incluyen aquí los receptores antigénicos de los linfocitos T y B, los anticuerpos, y las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (HMC).
- Tipo C₂: proteínas de adhesión celular y fijadoras del complemento. Se expresan constitutivamente en las células endoteliales, y se encuentran implicadas en el



proceso de migración de leucocitos. Una de sus funciones principales es la de interaccionar con integrinas receptoras. Existen 4 clases de proteínas de este tipo: moléculas de adhesión intercelulares (ICAMs), moléculas de adhesión vasculares (VCAMs), moléculas de adhesión entre el endotelio y las plaquetas (PECAMs) y las moléculas de unión adherente (JAMs) (Braunersreuther & Mach, 2006; Hordijk, 2006).

A continuación se describen las características de algunas de las moléculas de tipo C₂ más importantes que se localizan en las células endoteliales y que participan en el proceso inflamatorio:

a) Moléculas de Adhesión Intercelulares (ICAMs).

La **ICAM-1** se expresa de forma constitutiva tanto en las células endoteliales como en las células epiteliales, fibroblastos, monocitos, linfocitos y células dendríticas. Es estimulada por las citoquinas IL-1 e IFN- γ , por el TNF- α y por el LPS (Roebuck & Finnegan, 1999). Interviene en el proceso de migración de leucocitos (Braunersreuther & Mach, 2006; Millan et al., 2006) (Figura 11). Para que sea funcional, requiere de Ca²⁺ intracelular y de la participación de la proteína quinasa c (PKc) (Etienne-Manneville et al., 2000). Algunos de los receptores de ICAM-1 producen señales que regulan la producción de actina del citoesqueleto de las células endoteliales en los vasos de pequeño diámetro de los pulmones (Cook-Mills & Deem, 2005).

Otras moléculas del mismo grupo son la ICAM-2 e ICAM-3. La **ICAM-2** se expresa también de forma constitutiva en el endotelio, linfocitos, monocitos y plaquetas. Participa en las fases de adhesión firme y diapédesis de leucocitos durante la migración de estos por el endotelio vascular al interactuar con la integrina β 2 (Yadav et al., 2003). Además, es una molécula que media en la angiogénesis tanto *in vivo* como *in vitro*. Mediante estudios *in vitro* se ha observado que las células endoteliales deficientes en ICAM-2 muestran un patrón de migración anormal, así como un incremento en la apoptosis. También, se ha demostrado que activa la proteína Rac, molécula involucrada en la formación de canales que facilitan la trans migración endotelial de leucocitos (Huang et al., 2005). La **ICAM-3** se encuentra en linfocitos, monocitos y otras células polimorfonucleares que también participa en la migración leucocitaria.



b) Moléculas de Adhesión a Células Vasculares (VCAMs).

La **VCAM-1** se expresa en la superficie de las células endoteliales, monocitos, células dendríticas, fibroblastos y otras. Participa en las uniones intercelulares del endotelio vascular y en las fases de rodamiento y adhesión firme de linfocitos, basófilos, eosinófilos y monocitos por el endotelio interaccionando con la integrina $\beta 1$ de todos ellos (Figura 11). Dicha molécula estimulada, modifica la conformación de las células endoteliales, de tal manera que reestructura los filamentos de actina, abriendo un estrecho pasaje a través del endotelio, para que los leucocitos puedan llegar al tejido dañado (Braunersreuther & Mach, 2006; Dejana, 2006). Su expresión se incrementa por la acción de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias (IL-1, IL-4, IL-13 y TNF- α) y el LPS (Cook-Mills & Deem, 2005; Matheny et al., 2000; Yadav et al., 2003). Además, la VCAM-1 es capaz de activar la nicotinamida adenina dinucleótido fosfatasa (NADPH) oxidasa, que es la responsable de la estimulación de algunos productos reactivos derivados del oxígeno (ROS), que junto con las metaloproteinasas de la matriz (MMPs), controlan la migración leucocitaria debilitando las uniones fuertes entre células endoteliales adyacentes (Deem & Cook-Mills, 2004; Matheny et al., 2000; Hordijk, 2006).

c) Moléculas de Adhesión entre el endotelio y las plaquetas (PECAMs).

La **PECAM-1** se localiza en el endotelio vascular y también en plaquetas, leucocitos y células musculares. Forma parte de las uniones adherentes entre células endoteliales adyacentes y entre células endoteliales y leucocitos, interaccionando con las integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$ leucocitarias) junto con las cadherinas (Schmelz & Franke, 1993; Chiba et al., 1999; Nourshargh et al., 2006). Se expresa de forma constitutiva y se localiza en vesículas, de tal manera que se recicla continuamente. Cuando los leucocitos migran a través del endotelio se redistribuye a lo largo de toda la membrana celular endotelial y se concentra, específicamente, en los márgenes laterales de las células por donde pasan las células inmunitarias (Figura 11) (Mamdouh et al., 2003; Muller, 2003; Yadav et al., 2003; Cook-Mills & Deem, 2005; Braunersreuther & Mach, 2006; Dejana, 2006). Anticuerpos anti-PECAM-1 bloquean la trans migración de leucocitos (Shaw et al., 2001) y estimulan la liberación de proteasas por parte de los neutrófilos (no de monocitos), favoreciendo su paso a través de los espacios intercelulares (Adams et al.,



1994; Duncan et al., 1999; Jaitovich & Etcheverry, 2004). También participa en la regulación de la muerte celular programada (Dejana, 2004). La interacción homofílica de la PECAM-1 entre células endoteliales cierra los contactos intercelulares y recluta la fosfatasa SHP2. La unión entre estas dos proteínas parece ser que puede llegar a regular la activación de los componentes pre- y proapoptóticos.

d) Moléculas de Adhesión de Unión Adherente (JAMs).

Se localizan en las uniones ocluyentes intercelulares y en los bordes intercelulares de las células endoteliales y en la superficie de leucocitos, plaquetas y eritrocitos (Schmelz & Franke, 1993; Williams et al., 1999; Chavakis et al., 2004). Las JAMs parecen estar implicadas en el mantenimiento de la estructura de las uniones interendoteliales y en la trans migración leucocitaria mediada por integrinas (Figura 11) (Imhof & Aurrand-Lions, 2004). Existen varios tipos de JAMs. Las **JAM-A** y las **JAM-B** están distribuidas a lo largo de toda la superficie endotelial. Al igual que ocurre con la PECAM-1, cuando los leucocitos migran a través del endotelio, estas moléculas se redistribuyen por la membrana de las células endoteliales y forman un túnel por el que pasan las células inmunitarias, ayudadas por vesículas que la reciclan (Ma et al., 2003; Brauersreuther & Mach, 2006; Dejana, 2004). Se ha demostrado que los anticuerpos anti-JAM-A inhiben de forma espontánea la migración de leucocitos a través del endotelio (Martín-Padura et al., 1998; Ebnet et al., 2004). Las **JAM-C** median en la interacción entre células endoteliales y leucocitos y entre leucocitos y plaquetas durante su migración transendotelial (Yadav et al., 2003; Keiper et al., 2005a; Dejana, 2006). En concreto, las JAM-C expresadas en las células endoteliales se unen a las JAM-A presentes, también, en leucocitos y controlan su migración (Muller, 2003). Se ha demostrado que anticuerpos anti-JAM-C inhiben la diapédesis por el endotelio de las células mieloides que expresan la integrina β_2 a través del endotelio (Imhof & Aurrand-Lions, 2004).

5.2.2. Integrinas.

Son glicoproteínas de membrana que median en las uniones intercelulares, en las uniones célula-matriz extracelular, entre las células endoteliales y células T, entre los linfocitos B y T y entre plaquetas (Imhof & Aurrand-Lions, 2004). Existen 8 tipos de



integrinas: **$\beta 1$ a $\beta 8$** . Su función es la de integrar toda la información que hay en el medio extracelular con la actividad de la célula endotelial para que puedan generar diversas señales intracelulares. Intervienen en el proceso de migración de leucocitos en las fases de adhesión firme y en la diapédesis (Figura 11) (Yadav et al., 2003; Braunersreuther & Mach, 2006). La afinidad que posee hacia sus ligandos es muy baja y dependen de los iones Ca^{2+} y Mg^{2+} , lo que permite a las células adherirse débil pero simultáneamente a un gran número de moléculas de la matriz extracelular.

La deficiencia en **integrina $\beta 1$** es una de las causas de las alteraciones en la coagulación. La **integrina $\beta 2$** sólo se expresa exclusivamente en los linfocitos y participa en las fases de adhesión firme y migración transendotelial de leucocitos interaccionando con algunas moléculas de la familia de las inmunoglobulinas (ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, JAM-C) y con el grupo de las selectinas (E-selectina) (Imhof & Aurrand-Lions, 2004). Las **integrinas $\beta 3$ a $\beta 7$** se localizan también en plaquetas y leucocitos y participan en la agregación plaquetaria y promueven la fagocitosis en neutrófilos y monocitos (Carlos & Harlan, 1994; Jaitovich & Etcheverry, 2004).

5.2.3. Selectinas.

Esta familia está constituida por 3 glicoproteínas diferentes: E-selectina, P-selectina y L-selectina. El prefijo hace referencia al lugar donde fueron identificadas inicialmente (endotelio, plaquetas y leucocitos respectivamente) (Kishimoto & Rothlein, 1994). Las selectinas pueden expresarse como moléculas de superficie (E y L-selectinas), pueden ser almacenadas en los gránulos de las plaquetas o en los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales (P-selectina), o actuar como moléculas solubles (L-selectina) (Carlos & Harlan, 1994). Las interacciones de las selectinas con sus ligandos son transitorias, por lo que retardan la circulación de los leucocitos (Figura 9) (Yadav et al., 2003; Braunersreuther & Mach, 2006).

La **E-selectina** se expresa exclusivamente en células endoteliales durante el proceso inflamatorio (Bevilacqua et al., 1987). Se ha demostrado en cultivos *in vitro* que la IL-1, el TNF- α (citoquinas pro-inflamatorias) y/o el LPS estimulan su expresión durante las primeras 24-48 horas (Bevilacqua et al., 1987; Braunersreuther & Mach, 2006). Juega un papel muy importante en el rodamiento y la adhesión firme tardía de neutrófilos, eosinófilos, monocitos y linfocitos T al endotelio microvascular.



La **P-selectina** se encuentra presintetizada y almacenada en los cuerpos de *Weibel-Palade* de las células endoteliales y en los gránulos α de las plaquetas y se traslada rápidamente a la membrana durante la activación celular. Interviene en la adhesión firme de leucocitos al endotelio y, junto con la E-selectina, son las encargadas de retardar el rodamiento de leucocitos por el endotelio vascular activado (Hajilooi et al., 2004; Braunersreuther & Mach, 2006). Por último, la **L-selectina** se expresa de forma constitutiva en neutrófilos, monocitos, linfocitos T y B nuevos y en algunos tipos de células NK (Ley, 2003). Interviene en la adhesión firme de leucocitos al endotelio, sobre todo durante la migración de linfocitos hacia los nódulos linfoides periféricos y sitios de inflamación crónica. Al finalizar su actividad es rápidamente eliminada de la superficie de estas células por escisión enzimática (Braunersreuther & Mach, 2006).

5.2.4. Cadherinas.

Son proteínas homodiméricas que median en adhesiones intercelulares homofílicas dependientes de la temperatura y del Ca^{2+} entre células homo o heterotípicas para establecer uniones ocluyentes y adherentes (Schmelz & Franke, 1993; Muller, 2003; Dejana, 2004), y así mantener la integridad de los tejidos y la persistencia de los espacios intercelulares. También participan en el desarrollo y crecimiento embrionario, la implantación de los blastómeros, la morfogénesis, la migración celular y la diferenciación de los tejidos embrionarios. Por último, son proteínas que inducen la inhibición del crecimiento celular por contacto, activando el estancamiento de la mitosis en la fase G_1 (Dejana, 2004).

Existen varios tipos de cadherinas y su clasificación se ha establecido de acuerdo con las células donde fueron caracterizadas (E-, endotelio; P-, trofoblasto (placenta); N-, tejido neuronal; R-, músculo cardíaco; y M-, retina y mioblastos). De todas ellas, para nosotros, la más importante es la **E-cadherina**. Participa en las uniones adherentes entre células endoteliales, siendo una de las responsables de la integridad vascular y de la migración de los leucocitos, principalmente de los neutrófilos y monocitos (Figura 11). Los neutrófilos eliminan el dominio N-terminal de la E-cadherina mediante una elastasa superficial facilitando de esta forma, su migración (Dejana, 2004; Cook-Mills & Deem, 2005). No obstante, estudios *in vitro* demuestran que la **VE-cadherina** (E-cadherina vascular específica) actúa como guardián (*gatekeeper*) de la zona de entrada de



monocitos en su tránsito a través del endotelio, siendo empujada lateralmente, de forma transitoria, de las uniones adherentes (Shaw et al., 2001; Allport et al., 2000). Otros estudios han demostrado que anticuerpos monoclonales anti-VE-cadherina incrementan la permeabilidad de células endoteliales y aumentan la transmigración de neutrófilos (Cook-Mills & Deem, 2005). No se sabe si su desaparición es un requisito previo o una consecuencia de la diapédesis (Muller, 2003). Su capacidad de control es muy patente en los pulmones y en el corazón, pero no en otros órganos. La VE-cadherina reduce la respuesta celular mediada por el VEGF (Factor de Crecimiento Endotelial Vascular) (Imhof & Aurand-Lions, 2004). Para esta función, se asocia a varios receptores, como el VEGF receptor-2 (VEGFR-2), lo que causa la desfosforilación del receptor, y así la inhibición de la unión del mismo por su ligando. De esta manera inhibe la proliferación y estimula la supervivencia celular. También puede interactuar con otros receptores, como el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR-1), lo que significa que este fenómeno no es exclusivo de la unión VE-cadherina/VEGFR-2 (Dejana et al., 2004). De esta forma, las cadherinas forman complejos multiproteicos con receptores de factores de crecimiento y modulan la activación y la estabilidad de la membrana celular.

5.3. Otras moléculas producidas por las células endoteliales.

5.3.1. Óxido nítrico.

El óxido nítrico (NO) es sintetizado por diversos tipos de células como macrófagos, plaquetas y otros. El NO producido por el endotelio vascular actúa como un potente vasodilatador y relajante muscular con actividad antimicrobiana y antiparasitaria, directa o indirectamente (Brain & Grant, 2004). Es capaz de modular la producción de citoquinas (IL-8, IL-10, IL12, INF- γ , TNF- α) y quimioquinas (MCP-1) y, también, la de algunos factores de crecimiento como el TGF- β y el VEGF, causando efectos proinflamatorios y/o antiinflamatorios (Bogdan, 2001). Puede llegar a inhibir la adhesión de leucocitos y de plaquetas al endotelio vascular. Estudios con cultivos *in vitro* de células endoteliales, han demostrado que la producción de NO impide el rodamiento, la adhesión firme y la diapédesis de monocitos y granulocitos al endotelio (Grisham et al., 1998). Además, en el caso de los neutrófilos, puede llegar a inhibir la expresión de algunas integrinas.



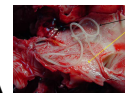
La actividad del NO no es restrictiva del sitio de producción siendo altamente difundible. No tiene un único receptor definido y puede reaccionar con moléculas inorgánicas (oxígeno, superóxido y metales transitorios), estructuras del ADN (ácido dextrirribonucleico), grupos protéticos u otras proteínas (Bruckdorfer, 2005).

En las células endoteliales, el NO es producido por sólo 2 de las 3 isoformas de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), que son la NOS endotelial (eNOS o NOS3) y la NOS inducible (iNOS o NOS2). La **eNOS** se expresa de forma constitutiva. Actúa como antiinflamatorio, antiapoptótico y promueve la actividad quimiotáctica. Su distribución puede afectar a la producción de NO. De hecho, existen lipoproteínas de baja densidad que provienen de fagocitos activados que pueden almacenarla y disminuir así su expresión y/o su función, afectando a su capacidad vasodilatadora (Nuszkowski et al., 2001). La **iNOS** cumple multitud de funciones diferentes y, a veces contrapuestas. En unos tipos celulares tiene capacidad antimicrobiana, antiapoptótica, proinflamatoria, quimiotáctica, e incrementa la respuesta Th₁ mientras que, en otras líneas celulares, disminuye la actividad citotóxica, el nivel de expresión de algunas citoquinas, como el INF- γ , y puede llegar a inhibir la actividad de las células T. Puede ser regulada por diferentes factores como el contacto celular, la acción sobre el endotelio vascular de poliaminas, antibióticos, citoquinas, productos microbianos, virales y de parásitos, etc. Todos ellos son capaces, además, de activar la producción de NO en macrófagos (Bruckdorfer, 2005).

Los parásitos, por sí solos, también puede producir NO. Esto se ha demostrado en *Giardia intestinalis*, *Brugia malayi*, *Trypanosoma cruzi*, *Ascaris suum*, *Schistosoma mansoni* y *Acanthocheilonema vitae*. En estos casos, la producción de NO depende de la incorporación de L-arginina exógena por parte del parásito (Pfarr et al., 2001). En el caso de *Trypanosoma cruzi*, la producción de NO, mediada por la iNOS a partir de la L-arginina, disminuye la apoptosis y la supervivencia del parásito (Bogdan, 2001). La depleción de la L-arginina por parte de los macrófagos inhibe el crecimiento de *Trypanosoma cruzi*, e incluso causa su muerte (Piacenza et al., 2001).

5.3.2. Factor de crecimiento endotelial vascular.

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es una proteína de señalización relacionada con la vasculogénesis, la angiogénesis y con los desórdenes de



permeabilidad en los vasos sanguíneos (Ferrara & Davis-Smyth, 1997; Neufeld et al., 1999). Su expresión es estimulada por factores de crecimiento de la epidermis, queratinocitos, plaquetas, y otros como los factores de crecimiento TGF- α , TGF- β y FGF, la insulina, algunas citoquinas (IL-1 α e IL-6) y en condiciones de hipoxia en circunstancias patofisiológicas. En humanos, el VEGF tiene varias isoformas. Dos de ellas (VEGF₁₂₁ y VEGF₁₆₅) son secretadas por células tumorales y son capaces de unirse a los receptores VEGFR-1 y VEGFR-2 de las células endoteliales (Ferrara et al., 2003). Las funciones del VEGF en células endoteliales son múltiples y variadas. Entre las más importantes están la activación de la vasodilatación de los vasos, la migración de neutrófilos y monocitos hacia el foco inflamatorio y la producción de proteínas antiapoptóticas, hecho muy importante para la supervivencia celular (Ku et al., 1993; Gaudry et al., 1997; Hood et al., 1998; Burns et al., 2003). Estudios *in vitro* han demostrado que el VEGF asociado a la VE-cadherina, promueve la supervivencia y la proliferación celular dependiendo si las células endoteliales están o no en confluencia. Si lo están, la VE-cadherina está ocluida en las uniones intercelulares y el VEGF induce preferentemente la supervivencia y no la proliferación celular y si no lo están, la VE-cadherina está difusa por la membrana celular y el VEGF media preferentemente en la proliferación y no en la supervivencia celular, de tal manera que las células se mueven (Gerber et al., 1998; Neufeld et al., 1999; Dejana, 2004).

5.4. El endotelio vascular en algunas parasitosis.

Existen muy pocos estudios que aborden las alteraciones del endotelio vascular durante la inflamación asociada a las filariosis, especialmente a la dirofilariosis.

Como ya se ha dicho con anterioridad, la patogénesis de la dirofilariosis ha sido atribuida mayoritariamente a la presencia física de los vermes adultos en las arterias pulmonares de los hospedadores. Sin embargo, todas las alteraciones patológicas de la dirofilariosis cardiopulmonar no pueden ser explicadas exclusivamente por esta causa, por lo que es evidente que existen otros factores relacionados con el parásito que probablemente contribuyan a su patogénesis (Kaiser et al., 1990; Lamb et al., 1993; Liu et al., 1990; Liu & Weller, 1992). Los únicos estudios existentes hasta el momento, relacionados con la influencia de *D. immitis* sobre las paredes vasculares han sido realizados por un equipo multidisciplinar de la Universidad de Michigan (EEUU).



Según estos trabajos, los vermes adultos de *D. immitis* liberan productos activos que cambian el comportamiento de las células endoteliales vasculares y no del músculo liso asociado, que contribuye a la alteración de la capacidad de relajación de las arterias pulmonares (Kaiser et al., 1989).

Kaiser et al. (1987) propusieron que los productos originados por el parásito estaban involucrados en la alteración de la relajación del endotelio, en perros infectados por *D. immitis* (Kaiser et al., 1989). El óxido nítrico (NO), los productos de la actividad de una ciclooxygenasa que no fueron especificados, la PGD₂ y la histamina son las moléculas responsables de dicha alteración (Kaiser et al., 1989; Mupanomunda et al., 1997).

Mediante observaciones realizadas *in vitro*, Lamb et al. (1993) demostraron que la capacidad de relajación del endotelio de la aorta de ratas disminuía cuando estaban en contacto con el suero procedente de perros infectados con *D. immitis*. No obstante, hay otros estudios que demuestran que la relajación de la arteria femoral de perros infectados por *D. immitis* no difiere de la de los no infectados, sugiriendo que los cambios observados *in vitro* son efímeros y para que se produzcan *in vivo* requieren de una continua exposición a factores circulantes de las filarias (Tithof et al., 1994).

Existen también estudios sobre otras parasitosis sanguíneas que abordan la interacción de los parásitos con el endotelio vascular del hospedador. La parte soluble del antígeno de los huevos de *S. haematobium* induce proliferación de las células endoteliales (El-Awady et al., 2001). Además, se ha demostrado que la esquistosómula de *Schistosoma mansoni* reduce la expresión de E-selectina y VCAM-1 en células endoteliales estimuladas previamente con TNF- α y que sus productos excretores/secretores actúan sobre la microvasculatura endotelial, con lo que los autores especulan que estos mecanismos podrían representar una estrategia por parte del parásito para evadir la respuesta inmune celular del hospedador (Trottein et al., 1999a y b). Por otra parte, la expresión de ICAM-1 e iNOS por células endoteliales se ve incrementada en ratones después de ser vacunados con cercarias de *Schistosoma mansoni* irradiadas (Ramaswamy et al., 1997) y los antígenos derivados del huevo incrementan también la producción de ICAM-1 (Ritter & McKerrow, 1996).

En otros estudios, realizados con *B. pahangi*, también se ha observado una disminución de la relajación del endotelio en la aorta de ratas infectadas (Kaiser et al.,



1991 y 1996). Sin embargo, Rao et al. (1996) estudiaron los cambios morfológicos de las células endoteliales en ratones infectados con *Brugia malayi* y observaron que su citoesqueleto estaba intacto y, además, no existían lesiones citoplasmáticas. Solamente observaron un descenso significativo del factor de crecimiento dependiente de la proliferación celular, en cultivos de células endoteliales *in vitro* de ratones infectados con vermes adultos y microfilarias.

Por último, en un estudio realizado *in vitro* en cultivos de células endoteliales en presencia de *Trypanosoma brucei gambiense* se ha demostrado que aumenta la producción de NO, ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina, en comparación con cultivos sin el parásito. Girard et al. (2005) especulan que son los productos del parásito los responsables de la activación de la expresión de dichas moléculas y la potenciación de la respuesta inflamatoria.

6. El diagnóstico de la dirofilariosis en los distintos hospedadores.

6.1. Diagnóstico de la dirofilariosis cardiopulmonar canina y felina.

El diagnóstico de la filariosis cardiopulmonar en el perro se basa en la identificación de antígenos circulantes del parásito adulto y de las microfilarias circulantes en muestras de suero y sangre respectivamente. Posteriores procedimientos diagnósticos son necesarios para determinar la gravedad de la enfermedad y la pauta terapéutica (Knight, 1995). Existen excelentes monografías que tratan este tema extensamente (Venco & Vezzoni, 2001; Genchi et al., 2007), por lo que aquí se presenta un resumen de las técnicas empleadas actualmente en la práctica clínica.

Identificación de las microfilarias en la sangre.

La muestra de sangre se examina al microscopio después de concentrarla (técnica de Knott/*Difill test* o filtración) para estudiar las microfilarias circulantes. La identificación y tipificación morfológica de las microfilarias de *D. immitis* tiene una especificidad del 100%. Los dos caracteres que permiten distinguir *D. immitis* de *D. (Nochtiella) repens* son la forma de la extremidad cefálica y la disposición del extremo



caudal: extremidad cefálica ahusada y cola rectilínea de *D. immitis*; extremidad cefálica redondeada y cola en forma de “mango de paraguas” de *D. (Nochtiella) repens*.

Alrededor del 30% de los perros infectados no presentan microfilarias circulantes, a pesar de albergar parásitos adultos. Las causas pueden ser diversas: infección por parásitos adultos del mismo sexo, respuesta inmunitaria del hospedador contra las microfilarias o administración de fármacos microfilaricidas. Este test no tiene una sensibilidad suficientemente alta para poder excluir la infección por *D. immitis* en caso de un resultado negativo.

Test de detección de antígenos circulantes de las hembras adultas.

Los tests para la detección de antígenos circulantes de las hembras adultas, basados en el método ELISA o inmunocromatográficos son considerados altamente específicos, no existiendo posibilidad de reacciones cruzadas con otros parásitos (*D. repens* o *Dipetalonema* sp., por ejemplo). Estos tests proporcionan información relacionada con la carga parasitaria (Knight, 1995; Venco et al., 2004). La sensibilidad es muy alta, pero es posible la aparición de falsos negativos en casos de infecciones recientes (ocurridas menos de 5 meses antes), cuando existe una carga parasitaria muy baja, o ante la presencia de vermes machos únicamente (McCall, 1992). Este tipo de tests, además de ser realizados en laboratorios de referencia, están también disponibles en los ambulatorios.

Técnicas moleculares.

La técnica de PCR permite la detección del ADN de una pequeña fracción de microfilaria. En teoría, mejora mucho la sensibilidad de los tests de detección de microfilarias, pero no sirve en casos de infecciones amicrofilarémicas. Se aplica experimentalmente, no existiendo, que nosotros sepamos, ningún test comercial.

Radiografía torácica.

Las radiografías torácicas pueden evidenciar, en los estadios avanzados de la enfermedad, un agrandamiento de las arterias pulmonares, anomalías del patrón pulmonar y en los casos más graves, cardiomegalia derecha. Se pueden poner de manifiesto ascitis e inflamación pleural en el desarrollo de una insuficiencia cardíaca



congestiva izquierda (Rawlings & Calvert, 1995; Calvert et al., 1998). El radiograma permite cuantificar la gravedad de las lesiones pulmonares pero no estima la carga parasitaria (Venco et al., 2004), porque los signos radiográficos de las lesiones pulmonares inducidas por la infección pueden persistir después de la fase aguda de la enfermedad.

Electrocardiografía.

El examen electrocardiográfico permite poner de manifiesto alteraciones del vector eléctrico y alteraciones del ritmo (desviaciones a la derecha en el asa eléctrica y fibrilaciones arteriales), solamente en los perros que se encuentran en la fase terminal de la enfermedad, con agrandamiento grave del atrio ventricular derecho.

Ecocardiografía.

El examen ecocardiográfico consiste en examinar directamente las cavidades cardiacas y los vasos anejos (Moise, 1988). Permite la visualización del parásito que se presenta como dos líneas paralelas hiperecogénas, en el atrio y ventrículo derechos, vena cava caudal y en el tracto proximal de la arteria pulmonar caudal (Moise, 1988; Badertscher et al., 1988). La ecocardiografía *Doppler* permite evaluar con precisión la presencia y gravedad de la hipertensión pulmonar

Este examen se considera en los casos en que los aspectos clínicos y radiográficos sugieren una infección grave, proporcionando una mayor certeza sobre el estadio de la enfermedad y en la estimación de la carga parasitaria, factores que influyen en la elección de la pauta terapéutica y la prognosis.

El diagnóstico de la dirofilariosis felina presenta implicaciones diferentes a la canina, dada la variable evolución de la enfermedad y la posibilidad de muerte súbita de los gatos parasitados. El diagnóstico precoz es de primordial importancia, para evitar las consecuencias de la llegada de los vermes al corazón. El método más utilizado para la detección del parásito en los gatos es el test para la detección de anticuerpos circulantes basado en la tecnología de la inmunocromatografía y del ELISA. Existen test comerciales que tienen una alta especificidad y sensibilidad, particularmente en gatos con infecciones experimentales (McCall et al., 1995; McCall, 1998; McCall, 2001).



Estos tests son recomendables para los gatos en los que se sospecha de su infección (Nelson et al., 1998; Levi et al., 2003; Levy et al., 2007) (Tabla 3).

Las ventajas y desventajas del diagnóstico por imagen y de las técnicas moleculares son similares a los que se presentan en perros. La detección de microfilarias tiene poco valor, ya que como se ha dicho anteriormente, la mayoría de los casos son amicrofilarémicos, y cuando hay microfilaremia es transitoria y de baja intensidad. Puesto que las infecciones naturales suelen estar producidas por 1-3 vermes, a veces inmaduros o de un solo sexo, la detección de los antígenos liberados por las hembras presenta baja sensibilidad.

	Morfología	Imagen	Serología	Biología molecular
	Knott/filtración	Radiología Ecografía	Detección de Ags o Acs circulantes	PCR
Perros	Sólo en casos microfilarémicos	Depende de la localización de los vermes	Universal (Ags)	Sólo en casos microfilarémicos
Gatos	No aplicable	Depende de la localización de los vermes	Universal (Acs)	No aplicable

Tabla 3. Métodos de diagnóstico de la dirofilariosis en perros y gatos.

6.2. Diagnóstico de la dirofilariosis pulmonar humana.

El diagnóstico de *D. immitis* en humanos plantea diferentes problemas desde el momento mismo de la detección. En el caso de nódulos pulmonares, estos pasan desapercibidos y sólo una parte son detectados accidentalmente por radiografía torácica, cuando es aplicada por otras causas no relacionadas con la dirofilariosis. Dado que la presencia de los nódulos pulmonares hace sospechar de un tumor maligno u otras condiciones patológicas, lo más importante es realizar el diagnóstico diferencial. Al ser una infección amicrofilarémica, en la mayoría de los casos, el diagnóstico se ha venido realizando mediante la aplicación de técnicas invasivas como toracotomía o punción/aspiración, para obtener biopsias que permitan la identificación de los parásitos



por histología (Simón & Genchi, 2000). Hace unos años se puso a punto la técnica de PCR (Favia et al., 1996) sobre vermes adultos de *D. immitis* conservados en distintos medios, con la excepción de la formalina. No obstante, en la práctica diagnóstica real, esta técnica no evita la intervención quirúrgica previa para obtener las muestras de tejido de los nódulos. Una alternativa a estos métodos es la serología. Como ya hemos comentado anteriormente, a pesar del escaso número de vermes que originan las infecciones humanas, existe una considerable respuesta de anticuerpos que puede ser usada para el diagnóstico.

En el diagnóstico de la dirofilariosis pulmonar humana se ha empleado experimentalmente una proteína recombinante de 35 kDa en ELISA, encontrándose que proporcionaba una especificidad y una sensibilidad muy elevada, incluso comparando con sueros de pacientes con filariosis tropicales. Nuestro laboratorio ha puesto a punto y patentado (Prieto et al., 2005) un método basado en la detección de anticuerpos en ELISA, empleando un grupo de péptidos sintéticos derivados de las moléculas de 22 y 33 kDa de *D. immitis* (Mejía & Carlow, 1994; Perera et al., 1994). No obstante, dada la baja probabilidad de enfrentarnos a un caso de dirofilariosis pulmonar en un caso de nódulo pulmonar, la positividad de un test serológico debe complementarse con la radiología, la zona de residencia, los antecedentes, etc., antes de aplicar cualquier tipo de medida.

7. Clasificación clínica, tratamiento y profilaxis de la dirofilariosis animal.

El tratamiento de la filariosis cardiopulmonar canina es complejo y a menudo no exento de riesgos para el paciente. Existen distintas estrategias terapéuticas y no se debe excluir la posibilidad de no aplicar tratamiento en algunos pacientes (Venco, 2007a).

Es muy importante, antes de implantar la terapia, evaluar y clasificar al paciente en una de las dos categorías de riesgo, sobre la base de algunos factores: número de parásitos estimados sobre la base del test ELISA, y examen, tamaño del perro y edad, considerando que los perros de mediana edad presentan mayor carga infestante (Venco et al., 2004). También deben ser tenidos en cuenta otros factores concomitantes de riesgo, tales como la gravedad de la enfermedad pulmonar y tipo de restricción de la



actividad física al cual puede ser expuesto el perro.

- **Bajo riesgo de complicaciones tromboembólicas:**

Baja carga infestante, ausencia de lesiones parenquimales y/o lesiones vasculares pulmonares.

Los perros incluidos en esta categoría deben cumplir las características siguientes:

- Ausencia de sintomatología clínica.
- Radiograma torácico normal.
- Bajo nivel de antígenos circulantes o test antigénico negativo asociado a microfilaremia.
- Ausencia de parásitos en el examen ecocardiográfico.
- Ausencia de enfermedades concomitantes.
- Posibilidad de limitar la actividad física del paciente.

- **Alto riesgo de complicaciones tromboembólicas:**

En este grupo deberán de ser incluidos los perros que cumplen una o más de estas condiciones:

- Síntomas relacionados con la enfermedad (tos y lipotimias).
- Radiogramas torácicos anormales.
- Altos niveles de antígenos circulantes.
- Visualización del parásito por examen ecocardiográfico.
- Enfermedades concomitantes.
- Imposibilidad de limitar la actividad física del paciente.

La terapia sintomática incluye la utilización de fármacos y medidas adecuadas para mejorar la circulación cardiopulmonar y la insuflación pulmonar, a fin de aliviar los síntomas en el perro que no queramos someter a terapia causal o en la preparación de aquellos que han de ser sometidos a terapia adulticida o quirúrgica. La restricción de la actividad física y en algunos casos el confinamiento en jaula, parece ser la medida mas importante para mejorar la circulación pulmonar y para reducir la hipertensión pulmonar (Dillon et al., 1995).



Los corticosteroides a dosis antiinflamatorias (prednisolona 2 mg/kg durante cuatro o cinco días) pueden mantener bajo control el nivel de inflamación pulmonar y los fenómenos tromboembólicos. El uso de diuréticos (furosamida 1mg/kg) es útil para reducir el desarrollo de la insuficiencia cardiaca congestiva. La digoxina se suministra exclusivamente para controlar las fibrilaciones atriales. El uso de aspirina es controvertido y el efecto antitrombótico en perros con filariosis cardiopulmonar no está demostrado, lo que desaconseja su uso empírico por sus posibles efectos colaterales. La utilización de opioides y oxigenoterapia está aconsejada en los casos en los cuales el paciente presente dificultad respiratoria.

Actualmente el único tratamiento adulticida aconsejado es el efectuado con cloridrato de melarsomina. El protocolo estándar prevé la administración de dos inyecciones por vía intramuscular cada 24 horas en dosis de 2,5 mg/kg. De hecho, la administración de una simple dosis de melarsomina reduce el 90% de los parásitos machos y el 10% de las hembras, causando la reducción del 50% de la carga parasitaria (muy seguro en términos de riesgo tromboembólico y en shock). Por este motivo, la *American Heartworm Society* recomienda un protocolo de tres inyecciones, las dos últimas administradas con separación de 24 horas, y después de 50 días de la primera. Éste es el tratamiento de elección practicado en numerosos hospitales veterinarios, independientemente del estadio de la enfermedad. La utilización de la terapia adulticida tiene como consecuencia un inevitable tromboembolismo pulmonar, sobre todo en el caso de que el número de parásitos muertos sea elevado. Para reducir el riesgo tromboembólico es fundamental la restricción de la actividad física del perro (vida exclusivamente en casa, y en los casos más graves reposo en jaula), durante los treinta o cuarenta días siguientes al tratamiento adulticida y es útil la utilización de heparina o dosis antiinflamatorias de glucocorticoides (Di Sacco et al., 1992; Rawlings & Calvert, 1995).

Actualmente se sabe que algunos macrólidos tienen capacidad adulticida. Estudios experimentales han demostrado que la ivermectina tiene efecto adulticida parcial si se suministra a dosis profilácticas de 6 a 12 µg/kg y mes durante 16 meses, mientras que si la administración se alarga a 30 meses consecutivos, la eficacia alcanza el 100% (McCall, 2001)

La terapia con ivermectina puede ser utilizada en casos raros seleccionados,



cuando la edad del paciente, la presencia de enfermedades concomitantes y las condiciones financieras del propietario no aconsejen el uso de melarsomina. No se aconseja el uso de macrólidos como terapia de elección, porque el efecto adulticida de la ivermectina requiere un tiempo demasiado largo. Durante este largo periodo de terapia, la infección continúa su desarrollo con el consecuente daño en la salud del perro, y los efectos de tromboembolismo se pueden manifestar de modo imprevisible. Observaciones clínicas nos muestran que animales positivos, sometidos a tratamiento con ivermectina mensual durante 24 meses, pueden manifestar un empeoramiento clínico (Venco et al., 2004).

La terapia quirúrgica, recomendable en los pacientes con síndrome de vena cava, es practicada con anestesia general, empleando *Flexible Alligator Forceps*, introducidos a través de la vena yugular. Este instrumento, con el auxilio del intensificador de brillo permite alcanzar la cavidad cardiaca derecha y la arteria pulmonar hasta sus ramificaciones lobulares (Ishihara et al., 1990).

El riesgo de mortalidad intraoperatoria es muy bajo. La tasa de supervivencia y de curación es tanto más alta cuantos más parásitos son extraídos. Es muy importante antes de intervenir quirúrgicamente, visualizar previo examen ecocardiográfico, que un suficiente número de parásitos son accesibles al *Flexible Alligator Forceps*. La extracción quirúrgica de las filarias puede evitar el riesgo de tromboembolismo pulmonar, a diferencia del tratamiento farmacológico adulticida (Moroni, 1998). Esta técnica, aunque requiere un instrumental sofisticado, además de un adecuado entrenamiento práctico, es considerada una alternativa segura.

Considerando la gravedad de la enfermedad y la dificultad y riesgos de la terapia en los perros expuestos a la infección, la profilaxis debe ser considerada una alternativa de fundamental importancia. El tratamiento profiláctico de elección, por eficacia y seguridad, se basa en la administración de lactonas macrocíclicas como ivermectina, óxido de milbemicina, moxidectina por vía oral, o selamectina (McTier et al., 1992) y después moxidectina en formulación spot, una vez al mes, iniciándose un mes antes del inicio del periodo de transmisión de la infección, y continuándola hasta un mes después del final del periodo de transmisión. Tales fármacos no impiden la inoculación de las larvas infestantes, pero impiden su desarrollo. En Estados Unidos está disponible la moxidectina inyectable en formulación de larga acción que garantiza una protección



durante 6 hasta 12 meses.

En gatos, la quimioprofilaxis mensual es sólo una opción efectiva y segura en áreas donde la dirofilariosis está considerada una enfermedad endémica para los perros y donde la existencia de vectores transmisores es posible. Existen diferentes tratamientos quimioprofilácticos que son empleados por los veterinarios. Dosis mensuales de ivermectina u óxido de milbemicina por vía oral y selamectina, imidacloprida o moxidectina más imidacloprida por vía tópica son los más habituales (Paul et al., 1992; Longhofer et al., 1995; Guerrero et al., 2002; Arther et al., 2005)

Se recomienda emplear tratamientos preventivos en los gatos de 8 semanas de edad y en los gatos adultos en los meses de riesgo de transmisión. Las dosis profilácticas mensuales y preventivas para cada individuo son 24 $\mu\text{g/kg}$ de peso con ivermectina, 2 mg/kg de óxido de milbemicina, 1 mg/kg de moxidectina y 6-12 mg/kg de selamectina. Estos tratamientos no interfieren en la detección de antígenos o anticuerpos con los test serológicos.

A los gatos en los que no es posible demostrar la presencia de vermes adultos a nivel vascular y pulmonar mediante los test de anticuerpos y radiología torácica, pero poseen una sintomatología evidente, se les administra un tratamiento sintomático el cual consiste en 2 mg/kg de peso de prednisolona por vía oral al día, disminuyendo la dosis gradualmente hasta 0,5 mg/kg de peso durante 2 semanas. Después, se detiene el tratamiento durante 2 semanas para aplicarlo nuevamente, también durante otras 2 semanas. En este tiempo, los efectos adversos del tratamiento deberían disminuir (Atkins et al., 1998). Dependiendo de las circunstancias, también se pueden emplear corticoides, soluciones electrolíticas, broncodilatadores y oxígeno por vía intranasal en los casos en los que los síntomas y el bienestar de los gatos empeoren. Los diuréticos son inapropiados. Las aspirinas y otras drogas antiinflamatorias no esteroideas pueden exacerbar la patología en el parénquima pulmonar.

En la actualidad se posee una insuficiente experiencia sobre la terapia adulticida en la dirofilariosis felina. Se desaconseja el uso de la melarsomina. Datos preliminares sugieren que es tóxica en gatos a dosis tan bajas como 3,5 mg/kg (McLeroy, 1998). La ivermectina aplicada mensualmente durante 2 años a 24 $\mu\text{g/kg}$ reduce la carga parasitaria en un 65% (Guerrero et al., 2002). El problema de los tratamientos



adulticidas es la reacción secundaria que se puede producir tras la muerte simultánea de los vermes.

La extracción de los vermes empleando *Flexible Alligator Forceps* es posible pero se desaconseja ya que es una técnica más delicada aun que en el perro (Venco et al., 1998a y b).

8. Medidas preventivas para el hombre.

Aunque los procesos que origina el parásito en el hombre son benignos, existen dos razones para tomar en consideración la dirofilariosis humana:

1. El descubrimiento accidental de nódulos subcutáneos, y sobre todo de los pulmonares, hace sospechar siempre de una causa maligna, por lo que se suele intervenir quirúrgicamente, produciendo un daño innecesario en los pacientes.

2. Hasta hace unos años, la dirofilariosis consistía en unos pocos casos clínicos publicados. En la actualidad, gracias a las técnicas de diagnóstico serológico, se ha demostrado que las poblaciones humanas residentes en áreas endémicas presentan seroprevalencias cercanas a las que aparecen en las poblaciones caninas de esas mismas áreas y, en principio, cualquier persona que resulte infectada puede desarrollar nódulos subcutáneos y/o pulmonares. En los foros más prestigiosos se recomienda que la dirofilariosis sea incluida en el diagnóstico diferencial de nódulos pulmonares y subcutáneos, con la consiguiente demanda de métodos de diagnóstico fiables y en lo posible no invasivos (Simón et al., 2005; Theis, 2005). Cuando lleguemos a esa situación estaremos en condiciones de evitar, al menos en parte, la iatrogenia derivada de su descubrimiento y los costes que dichas intervenciones quirúrgicas ocasionan.





Dirofilaria immitis parasita a distintos hospedadores, fundamentalmente a perros, gatos y al hombre. En cada uno de ellos el desarrollo del parásito es diferente y la clínica presenta características particulares. No obstante, en todos los hospedadores la patología tiene un componente inflamatorio común muy importante. A este respecto, las bacterias endosimbiontes del género *Wolbachia* son una parte abundante y estable en los vermes de *D. immitis*, que participan en el estímulo de las reacciones inmunes e inflamatorias durante la dirofilariosis, además de la participación de los componentes del propio parásito.

En los reservorios animales la dirofilariosis cardiopulmonar comienza cuando los vermes adultos alcanzan las arterias pulmonares. El endotelio de los vasos está expuesto de manera continua a la acción de los antígenos procedentes de los parásitos, incluidos los de las bacterias simbiotes, que contribuyen al desarrollo de las alteraciones a nivel vascular y pulmonar y que son claves para el curso posterior de la enfermedad. Por lo general, ésta muestra un desarrollo crónico y predecible, pero si ocurre la muerte simultánea y súbita de muchos vermes, aparecen procesos agudos que pueden ser extremadamente graves e incluso mortales.

A pesar de que el desarrollo de la dirofilariosis cardiopulmonar y sus signos y síntomas han sido descritos de manera precisa, muchos de los mecanismos patogénicos y de las moléculas implicadas no se conocen adecuadamente. En los últimos años, tanto nuestro grupo, como otros grupos de investigación europeos, han estudiado las reacciones inmunes e inflamatorias a nivel sanguíneo, pero existen lagunas que impiden la correcta interpretación de algunos aspectos de la patología inflamatoria de esta enfermedad.

Por estas razones, se ha diseñado la investigación que se presenta en esta Tesis Doctoral, enfocada sobre aspectos no estudiados o poco conocidos de la dirofilariosis cardiopulmonar, con los siguientes objetivos específicos:

1. Identificar la presencia de eicosanoides en hospedadores infectados con *D. immitis* y sus cambios a lo largo de la infección, ya que son las moléculas clave en la regulación del tipo de respuesta inmunitaria desarrollada por los hospedadores y responsables de mecanismos fundamentales en la patología inflamatoria.



2. Diseñar un modelo de experimental basado en el cultivo *in vitro* de células endoteliales vasculares que permita analizar la influencia de los antígenos de *D. immitis* y de *Wolbachia* sobre el endotelio vascular.

3. Identificar los mecanismos celulares y moleculares de la inflamación aguda en el endotelio vascular cuando se produce la muerte súbita de vermes adultos de *D. immitis*, hecho bastante habitual y que ocurre por diversas causas.



MATERIALES Y MÉTODOS



Todos los productos, soluciones y aparatos empleados para el desarrollo de esta Tesis Doctoral se muestran en los Anexos I, II y III.

1. Estudios en hospedadores naturales.

1.1. Muestras de sangre.

Se obtuvieron muestras de sangre de perros, gatos y personas infectados con *D. immitis*, así como de individuos sanos. Estos últimos se utilizaron como controles.

1.1.1. Perros.

Se emplearon muestras de sangre de 178 perros recogidas mediante vacutainers de 0,9 x 25 mm y tubos al vacío de 3 ml tratados con ácido etilendiamina tetraacético tripotásico (EDTA K₃). Parte de esta sangre se empleó para el recuento de microfilarias y el test de antígenos, dedicándose el resto para la obtención de suero. Su procedencia fue la siguiente:

- 143 muestras de sangre de perros residentes en las zonas endémicas del valle del Tormes (provincia de Salamanca, España), recogidas por miembros de nuestro laboratorio; de la isla de Gran Canaria, proporcionadas por el Dr. Alberto Montoya de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (Islas Canarias, España); y del valle del Po (provincia de Milán, Italia), proporcionadas por el Dr. Claudio Genchi de la Universidad de Milán (Italia).

- 35 muestras de sangre de perros residentes en una zona no endémica del sur de la provincia de Salamanca (España) que también fueron recogidas por miembros de nuestro laboratorio.

1.1.2. Gatos.

Se emplearon muestras de sangre de 114 gatos infectados natural o experimentalmente, así como de gatos sanos.

- ◆ 65 muestras de sangre de gatos procedentes de diferentes zonas endémicas de dirofilariosis la isla de Gran Canaria (Islas Canarias, España) y del valle del Po (Milán, Italia) proporcionadas por el Dr. Luigi Venco de la Clínica Veterinaria *Città di Pavia* (Pavía, Italia) y, también, por los doctores Claudio Genchi (Universidad de Milán,



Italia) y Alberto Montoya (Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Islas Canarias, España).

- ◆ 30 muestras de sangre de gatos procedentes de zona no endémica sin manifestaciones clínicas que pudieran relacionarse con la dirofilariosis ni con alguna otra enfermedad obtenidas pertenecientes a la seroteca de nuestro laboratorio.

- ◆ 10 gatos infectados experimentalmente mediante la inyección inguinal de 50 L₃ de *D. immitis*. Las muestras de sangre se obtuvieron antes de la infección (Día -1), así como 2, 4 y 6 meses postinfección (p.i.). A los 6 meses p.i. los gatos fueron sacrificados y se examinaron las arterias pulmonares y el corazón. Estas muestras fueron proporcionadas por el Dr. Claudio Genchi de la Universidad de Milán (Italia). Todos los gatos fueron sacrificados al final del experimento. En ellos se encontraron de 1 a 4 vermes adultos en las arterias pulmonares y/o en el ventrículo derecho del corazón. En 3 gatos se encontraron solamente vermes adultos macho, en 5 sólo hembras y en 2 gatos un macho y una hembra.

- ◆ 9 gatos infectados experimentalmente, de la misma forma que en el caso anterior y tratados con ivermectina (24 µg/kg) a los 30 días después de la infección. Las muestras de sangre se obtuvieron antes de la infección (Día -1), a los 45 días p.i. (15 días postratamiento, p.t.), a los 4 meses p.i. (3 meses p.t.), a los 5,5 meses p.i. (4,5 meses p.t.) e inmediatamente antes de ser sometidos a eutanasia a los 6,5 meses p.i. (5,5 meses p.t.). Al igual que antes, estas muestras fueron proporcionadas por el Dr. Claudio Genchi de la Universidad de Milán (Italia). En ninguno de los gatos tratados y sacrificados al final del experimento se encontraron vermes adultos en las arterias pulmonares o en el ventrículo derecho del corazón.

1.1.3. Humanos.

Se analizaron 383 muestras de sangre humana proporcionadas por diferentes servicios hospitalarios y centros de prevención de Estados Unidos, Austria, Italia y España.

- 10 muestras de sangre procedían de pacientes que padecían dirofilariosis pulmonar causada por *D. immitis*, diagnosticados por histología. Estas muestras fueron proporcionadas por el Dr. Patrick Lammie del *Center for Diseases Control and Prevention* (C.D.C.) (Atlanta, EEUU).



■ 326 muestras de sangre de individuos residentes en distintas zonas endémicas de Europa (Austria, Italia, España) recibidas en nuestro laboratorio.

■ 47 muestras de sangre de individuos residentes en una zona no endémica del sur de la provincia de Salamanca recibidas, también, en nuestro laboratorio.

1.2. Obtención de sueros.

Las muestras de sangre se mantuvieron durante 12 horas a 4°C para dar tiempo a la formación del coágulo y, posteriormente, se centrifugaron a 800 xg durante 10 minutos. El suero se almacenó en eppendorffs de 1,5 ml a -80°C. Las muestras de suero se utilizaron, en todos los casos, para los análisis inmunológicos y para la detección de eicosanoides.

1.3. Preparación de antígenos.

Se emplearon 3 tipos de antígenos:

- Extracto antigénico de vermes adultos de *D. immitis* (DiSA).
- Péptidos sintéticos, dos derivados de la molécula de 22 kDa y cuatro de la de 33 kDa de vermes adultos de *D. immitis* (Dipp).
- Proteína recombinante de la cubierta de *Wolbachia* (WSPr).

1.3.1. Extracto antigénico de vermes adultos de *D. immitis*.

En primer lugar se obtuvieron vermes adultos de *D. immitis* a partir de perros con dirofilariosis cardiopulmonar a través de la vena yugular por el Dr. Luigi Venco de la *Clínica Veterinaria Città di Pavia* (Pavía, Italia) (Ishihara et al., 1986; Ishihara et al., 1990; Furlanello et al., 1998). Los vermes adultos se lavaron 3 veces con suero fisiológico estéril. Parte de los mismos se congelaron a -80°C y otra parte se conservó en formalina neutralizada al 10% hasta su procesamiento.

El extracto antigénico de *D. immitis* (DiSA) se preparó siguiendo la técnica descrita por Tamashiro et al. (1985), con algunas modificaciones. En primer lugar, los vermes adultos de *D. immitis* se maceraron en PBS estéril (proporción 3:1 V/P) y con una de inhibidores de proteasas. El macerado se sonicó mediante 3 ciclos de 70 Khz durante 30 segundos a intervalos de 1 minuto, en hielo. La suspensión resultante se



centrifugó a 10.000 xg durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se recogió en eppendorfs estériles de 1,5 ml y se almacenó a -80°C. El precipitado se resuspendió en 1 ml de PBS repitiendo el proceso anterior. El sobrenadante fue almacenado nuevamente y el sedimento eliminado.

Los sobrenadantes fueron sometidos al test *Limulus Amebocyte Lysate*, siguiendo las indicaciones del fabricante, para verificar si existía contaminación con el lipopolisacárido (LPS) o con otras endotoxinas. Las muestras de DiSA se consideraron no contaminadas ya que se encontraron valores por debajo de 0,4 U/mg.

1.3.2. Péptidos sintéticos derivados de *D. immitis*.

Se empleó una mezcla de 6 péptidos sintéticos (Dipp), 2 derivados de la molécula de 22 kDa (Di₂₂) y 4 derivados de la molécula de 33 kDa (Di₃₃), de los vermes adultos de *D. immitis* (Frank et al., 1998, Frank et al., 1999). Las secuencias habían sido previamente diseñadas (Marcos-Atxutegi et al., 2003) mediante el algoritmo de GOR de predicción de la estructura secundaria, versión IV (Garnier et al., 1996) y sintetizadas por ISOGEN Biosciencie BV. Los péptidos liofilizados fueron resuspendidos en PBS estéril. La secuencia de aminoácidos de cada uno de ellos fue:

✓ *Péptidos derivados de Di₂₂*:

(NH₂)-KCSDIAPCQLTAVQS-(COOH)

(NH₂)-MGIANQVTQLISQGR-(COOH)

✓ *Péptidos derivados de Di₃₃*:

(NH₂)-KEEVKESLEERRKG-(COOH)

(NH₂)-TQLKTFDAKMTA-(COOH)

(NH₂)-SSTIQKQVDS-(COOH)

(NH₂)-RTEATSQASDDATA-(COOH)

1.3.3. Proteína recombinante de la cubierta de *Wolbachia*.

La forma recombinante de la proteína dominante de la cubierta de la bacteria endosimbionte *Wolbachia* (WSP_r) se obtuvo en el Departamento de Patología Animal, Higiene y Sanidad Publica Veterinaria de la Universidad de Milán (Italia) siguiendo al



metodología descrita por Bazzocchi et al. (2003) para los análisis inmunológicos y Bazzocchi et al. (2007) para el tratamiento de cultivos de células endoteliales.

La proteína WSPr se obtuvo a partir de una cola de 6 histidinas, necesarias para su purificación con una columna de afinidad. La cepa M15pRep4 de *Escherichia coli* con el plásmido WSP-PDS56 insertado creció a 37°C en agitación vigorosa en un tubo con 50 ml de medio *Luria Bertoni* (LB) estéril, suplementado con 100 µg/ml de ampicilina y 25 µg/ml de kanamicina. El crecimiento bacteriano se fue midiendo a 600 nm en un espectrofotómetro. Cuando el cultivo bacteriano alcanzó una densidad óptica (D.O.) de 0,5, se añadió isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) 1 mM para activar la síntesis de la WSPr. A las 2 horas, el cultivo bacteriano se centrifugó a 4.000 xg durante 20 minutos. Las células sedimentadas se lisaron mediante choque térmico y se sonicaron en 10 ml de tampón de lisis. Después se centrifugó a 10.000 xg durante 10 minutos. El sedimento se solubilizó en condiciones desnaturalizantes en 4 ml de un tampón urea 3 M. Después se volvió a centrifugar y a continuación se añadió un tampón urea 6 M para solubilizar la proteína WSPr. La purificación de WSPr se realizó mediante cromatografía de afinidad de alta presión (HPLC) con una columna MC/M 2,1 x 30 mm y una matriz de ácido nitrilotriacético con residuos de cobre. La proteína recombinante se eluyó añadiendo un tampón de imidazol 100 mM para que la proteína se renaturalizase. Para comprobar su purificación, se visualizó mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida al 8% teñido con azul de *Coomassie* (1 µg/muestra), visualizándose una banda a 24 kDa. Esta proteína se empleó para realizar los análisis inmunológicos.

La posible contaminación de WSPr con LPS u otras endotoxinas procedentes de *Escherichia coli*, donde fue clonada y expresada, se eliminó dializando WSPr 4 veces a través de una membrana de intercambio aniónico, verificando la ausencia de LPS con el test *Limulus Amebocyte Lysate* como se indicó en el apartado 1.4.1. de Materiales y Métodos. Después de realizar de nuevo una electroforesis para comprobar que la proteína no se había degradado.

En los estudios de células endoteliales tratadas con WSPr fue necesario el empleo de otro control interno, aparte de dicho test. La WSPr se desnaturalizó y degradó a 95°C durante 10 minutos. Después se centrifugó a 16.000 xg durante 10 minutos a 4°C.



1.4. Cuantificación de proteínas.

Este método está basado en el método de Lowry (Lowry et al., 1951). Para valorar la concentración de proteínas de DiSA y WSPr se empleó el kit comercial BCA siguiendo las instrucciones del fabricante. La absorbancia se leyó a 562 nm en un espectrofotómetro.

1.5. Técnicas relacionadas con la selección de muestras de suero.

1.5.1. Test de Knott.

La presencia y el número de microfilarias en las muestras de sangre de los perros se determinó mediante el test de Knott (Lawrence et al., 1989). Se hemolizó 1 ml de sangre en 9 ml de formol al 2%. Se centrifugó durante 5 minutos a 200 xg y se eliminó el sobrenadante. Para conseguir un sedimento libre de células hemáticas se resuspendió nuevamente en formol al 2% y se centrifugó de nuevo. Posteriormente se añadieron al sedimento unas gotas de azul de metileno al 10% y, una vez mezclado convenientemente, se procedió al recuento de microfilarias presentes en 25 μ l al microscopio. El recuento se realizó tres veces en cada muestra de sangre, hallándose la media de los recuentos. Los resultados se expresaron como microfilarias por ml de sangre de cada perro.

1.5.2. Tests comerciales de diagnóstico.

1.5.2.1. Test para la detección de antígenos circulantes de *D. immitis*.

Para la detección de antígenos circulantes de *D. immitis* en perros, se empleó el test comercial *Canine Heartworm Antigen Test Kit* (Laboratorios IDEXX), homologado a tal efecto, siguiendo las indicaciones del fabricante. Las muestras se analizaron siempre por duplicado. La coloración azul de las muestras analizadas con este test se consideró como resultado positivo bajo, moderado o alto dependiendo de su intensidad. Todo el proceso se realizó a temperatura ambiente.



1.5.2.2. Test para la detección de anticuerpos anti-*D. immitis*.

Para la detección de anticuerpos circulantes anti-*D. immitis* en gatos, se empleó el test comercial Heska™ *Solo Step*™, homologado a tal efecto, siguiendo las instrucciones del fabricante. Utilizando una gota de sangre del animal, se obtiene el resultado (positivo/negativo) al cabo de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente. Cuando apareció una banda roja, el resultado se consideró negativo y, cuando aparecieron dos bandas rojas, el resultado se consideró positivo.

1.5.3. Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para la detección de anticuerpos anti-*Dirofilaria immitis* y anti-*Wolbachia*.

La técnica de ELISA está basada en la capacidad de detección de forma directa o indirecta de complejos antígeno-anticuerpo marcados produciendo una reacción cuantificable por espectrofotometría (Engvall et al., 1971; Voller et al., 1978).

Se analizó la respuesta de anticuerpos específicos contra antígenos de *D. immitis* y de *Wolbachia* en los sueros de perros, gatos y humanos mediante el uso de 6 péptidos sintéticos derivados de vermes adultos de *D. immitis* (Dipp) y la molécula mayoritaria de la pared de *Wolbachia* en su forma recombinante (WSPr). La metodología empleada fue la descrita por Simón et al. (2003b) con algunas modificaciones. Se tapizaron placas de 96 pocillos con 0,8 µg de Dipp y 0,3 µg de WSPr por pocillo, dependiendo del análisis a realizar, en 200 µl/pocillo de tampón carbonato y se incubaron durante 16 horas a 4°C. Las placas se lavaron 3 veces con 200 µl/pocillo de tampón Tween₂₀ cuando se empleó Dipp o tampón de lavado para WSPr. El primer lavado fue de 3 minutos y los otros dos de un minuto. Luego se añadieron 200 µl/pocillo de tampón postapizante (Suero de albúmina bovina (BSA) 5% para Dipp y BSA 1% para WSPr) incubándose 1 hora a 37°C. Se repitió el lavado y se incubaron 100 µl/pocillo de suero de perros, gatos y/o humanos en tampón diluyente durante 1 hora a 37°C. Para los análisis con Dipp se empleó una dilución 1:40 en gatos y 1:10 en humanos y con WSPr 1:80 en perros, 1:40 en gatos y 1:30 en humanos. Las placas se lavaron nuevamente y en cada pocillo se incubaron 100 µl/pocillo de una IgG específica marcada con peroxidasa de rábado (HRP) anti-perro, gato o humano a una dilución 1:4.000 en tampón diluyente durante 2 horas a 37°C. Se repitieron los lavados y la reacción Ag-Ac



se reveló empleando 100 µl/pocillo de tampón sustrato incubando la reacción a temperatura ambiente y en oscuridad durante 10 minutos. Por último, la reacción se detuvo con 100µl/pocillo de ácido sulfúrico 3 N. La absorbancia fue medida en un espectrofotómetro a 492 nm. El límite de positividad en D.O. para el ELISA Dipp fue de 0,5 y para el ELISA WSPr de 0,6 tanto para las muestras de los animales como para las de los humanos. Los sueros se analizaron siempre por duplicado.

1.6. Criterios de clasificación de los hospedadores incluidos en el estudio.

Teniendo en cuenta las recomendaciones de la *American Heartworm Society* (EEUU) para el diagnóstico de la dirofilariosis animal, y la experiencia de nuestro grupo en la dirofilariosis humana, y tras las pruebas diagnósticas pertinentes (ver apartado 1.5 de Materiales y Métodos), los sueros se clasificaron con arreglo a los siguientes criterios:

✓ Perros.

- *Infección microfilarémica.*- Test de antígenos positivo con o sin síntomas y signos relacionables y test de Knott positivo.

- *Infección amicrofilarémica.*- Test de antígenos positivo con o sin síntomas y signos relacionables y test de Knott negativo.

✓ Gatos.

- Test de anticuerpos anti-*D. immitis* consignándose la presencia o ausencia de síntomas y signos relacionables con la dirofilariosis.

✓ Humanos.

- *Dirofilariosis pulmonar humana.*- Histología que demuestre la presencia de vermes en los nódulos pulmonares.

- *Individuos seropositivos sanos.*- Serología positiva de anticuerpos anti-*D. immitis*, sin síntomas o signos relacionables con la dirofilariosis.



En todas las muestras, además, se analizó la presencia de anticuerpos contra la bacteria endosimbionte *Wolbachia* (anti-WSP), que sirve de confirmación y aporta datos de interés para el trabajo.

1.7. ELISAs comerciales para la detección de los eicosanoides PGE₂, TxB₂ y LTB₄.

Se emplearon ELISAs comerciales para estudiar la presencia de PGE₂, TxB₂ y LTB₄ en las muestras de suero de perros, gatos y humanos y en el medio de cultivo recogido de los cultivos de células endoteliales tratados y no tratados (ver apartado 2 de Materiales y Métodos). Todas las muestras se analizaron por duplicado.

Para detectar PGE₂ se empleó el kit comercial *Parameter*TM PGE₂ Assay siguiendo las indicaciones del fabricante. Las muestras de suero se emplearon a una dilución 1:10 y las del medio de cultivo no se diluyeron. Todas las muestras se midieron a 450 nm en un espectrofotómetro con un filtro de corrección entre 540 nm y 570 nm.

Para detectar TxB₂ se empleó el kit comercial *Thromboxane B₂ Immunoassay* y para LTB₄ se empleó el kit *LTB₄ Immunoassay*, siguiendo las indicaciones del fabricante. En este caso, las muestras de suero y de medio de cultivo no se diluyeron. La absorbancia se leyó a 405 nm en un espectrofotómetro con un filtro de corrección entre 570 nm y 590 nm.

1.8. Inmunohistoquímica.

La presencia de *Wolbachia* en los vermes adultos de *D. immitis* se puso de manifiesto con la técnica de inmunohistoquímica. Se fundamenta en el reconocimiento específico de proteínas con anticuerpos marcados con un cromógeno para que puedan ser localizadas en los tejidos (Kramer et al., 2005).

1.8.1. Inclusión en parafina y preparación de las secciones.

Los vermes adultos de *D. immitis* conservados en formalina neutralizada al 10%, se trocearon con un bisturí y se introdujeron en un *casette* de tejido. Estos se pusieron en agua corriente durante 2 horas para que se rehidrataran los tejidos del verme. Después se realizó una deshidratación secuencial (etanol absoluto desnaturalizado al 70,



90 y 95% 2 horas cada uno de ellos) y finalmente en etanol absoluto desnaturalizado 3 horas para dejarlo sumergido toda la noche en etanol absoluto desnaturalizado no empleado con anterioridad. A la mañana siguiente, los *cassettes* se introdujeron 2 horas en xileno y después, se sumergieron 2 horas en parafina y otras 2 horas en parafina renovada en una estufa a 58°C. Posteriormente, en un molde metálico, se introdujeron los trozos de los vermes y se rellenó con parafina líquida a 58°C en un aparato de inclusión. Finalmente el molde se dejó en hielo durante 30 minutos para que los vermes quedaran incluidos. En un criotomo se cortaron secciones de 30 μm hasta que la sección fuese uniforme y después se realizaron cortes de 6 μm . Con un pincel se pasaron a un baño con agua destilada a 35°C para que las secciones se extendieran, luego se colocaron en un portaobjetos tratado con polilisina y se metieron en una estufa a 48°C toda la noche.

1.8.2. Procesado de las secciones.

Usando una campana de extracción de gases, los portaobjetos se sumergieron en xileno durante 5 minutos, en xileno nuevo otros 5 minutos, en etanol absoluto desnaturalizado 5 minutos y finalmente, en agua bidestilada otros 5 minutos. Fuera de la campana, se sumergieron en un recipiente con agua oxigenada al 2% durante 10 minutos y se lavaron en PBS durante 5 minutos. A continuación se colocaron los portas en una caja con ambiente húmedo y las secciones se bloquearon durante 20 minutos con 100 μl de un anticuerpo de cabra diluido en PBS (1:10). Seguidamente se incubaron con 100 μl de anti-WSP (Ac 1°) diluido en PBS (1:200) durante 30 minutos en la misma caja húmeda y después, se lavaron 2 veces con PBS durante 5 minutos. Luego se añadieron, a cada portaobjetos, unas gotas de un Ac 2° biotinilado, que se incubó durante 15 minutos. Después, se lavaron de nuevo y se incubaron durante 15 minutos con unas gotas de estreptavidina-HRP para amplificar la respuesta al anticuerpo. Después de otros 2 lavados de 5 minutos, se le añadió un cromógeno durante 5-15 minutos, parándose la reacción con 2 lavados de PBS de 5 minutos cada uno. Los portas se sumergieron 2 minutos en hematoxilina y se lavaron durante 5 minutos en un recipiente grande con agua corriente. Para finalizar, se añadieron unas gotas de una solución acuosa para montar las preparaciones con un cubreobjetos y se dejaron secar durante toda la noche en la campana de extracción para que poder



visualizar las secciones transversales de los vermes adultos de *D. immitis* en un microscopio invertido. El Ac 1° y el de cabra fueron producidos por el Departamento de Patología Animal, Higiene y Sanidad Pública Veterinaria de la Universidad de Milán (Italia).

2. Estudios en cultivos de células endoteliales.

2.1. Células endoteliales vasculares.

Se empleó un cultivo de células endoteliales humanas HAAE-1 (ATCC) procedentes de la aorta de un individuo de 20 años. Partimos de un vial conservado a -80°C que contenía $1,5 \times 10^6$ células criopreservadas.

El mantenimiento y expansión (Figura 12) del cultivo celular se realizó en medio Ham F12k, modificado con 2 mM de L-glutamina y 1,5 g/L de bicarbonato sódico, y suplementado con 0,03 mg/ml de factor de crecimiento endotelial (ECGS), 0,1 mg/ml de heparina, 50 U/ml de penicilina, 50 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomycin, y suero fetal bovino (FBS) al 10%, en un incubador de CO_2 a 37°C con una humedad ambiental del 5% de CO_2 y 95% de aire. Todos los suplementos se filtraron previamente con un filtro de 0,22 μm a excepción del FBS para evitar la contaminación bacteriana.

Estas células son sensibles a la acidificación y a la contaminación del medio. Por este motivo, el medio del cultivo se renovó cada 2 ó 3 días en una campana de flujo laminar. En primer lugar, el medio de cultivo se calentó a 37°C y se dejó en el incubador de CO_2 durante 15 minutos para que se basificara. Después, se eliminó el medio viejo con una bomba de vacío y las células se lavaron 2 veces con PBS estéril a 37°C . Finalmente, se añadió medio nuevo y basificado al cultivo de células endoteliales.

Durante los estudios se emplearon diferentes soportes de plástico como botellas de cultivo de 75 cm^2 , placas de 24 pocillos y placas petri de 60 y 100 mm de diámetro. Todos ellos se trataron previamente con gelatina de cerdo al 0,1% durante 10 minutos en un incubador de CO_2 . Para las placas de 24 pocillos se emplearon 500 μl de medio de cultivo, para las placas petri de 60 y 100 mm de diámetro, 2 y 3 ml de medio respectivamente, y para las botellas de cultivo de 75 cm^2 se emplearon 5 ml. Para los cambios de medio de cultivo se emplearon pipetas de plástico estériles de 5, 10 y 25 ml.



2.2. Técnicas de cultivo.

2.2.1. Tripsinización.

Para despegar las células de cualquiera de los soportes de plástico empleados se utilizó una solución comercial de tripsina 0,25%/EDTA 0,03%. La tripsinización sólo se realizó sobre los cultivos celulares mantenidos en placas petri de 100 mm de diámetro y en las botellas de cultivo de 75 cm². Las células endoteliales se lavaron 2 veces con 10 y 20 ml de PBS estéril. A continuación se añadieron 2 ml de tripsina/EDTA sobre las placas petri de 100 mm de diámetro y 3 ml en las botellas de cultivo de 75 cm² y se mantuvieron durante 5 minutos en un incubador de CO₂ para despegar las células de dichos soportes. La acción de la solución de tripsina/EDTA se inhibió añadiendo un volumen de medio de cultivo 3 veces superior al de dicha solución. La suspensión se recogió en un tubo estéril de 15 ó 50 ml, se homogeneizó 10 veces con una micropipeta de 100-1000 µl y se procedió a realizar la siembra previo recuento celular.

2.2.2. Recuento celular.

Para el recuento celular fue necesario el empleo de una cámara de *Neubauer* donde están dibujadas 2 cruces cuadrículadas. Primero, se añadieron a cada una de las 2 cuadrículas 25 µl de una mezcla de 100 µl de *trypan blue* al 0,4% y 100 µl de la suspensión celular para cubrir ambas superficies, y después, se procedió al recuento de las células vivas. El *trypan blue* es un colorante de exclusión con el que se puede discriminar entre células muertas (color azul) y células vivas (color blanco). Primero se contaron las células vivas en las 2 cuadrículas, luego se sumaron ambos números, el resultado se multiplicó por 2 (dilución previa: 100 µl de medio) y, por último, se multiplicó por 10³ para dar el resultado final en número de células/ml de medio.

2.2.3. Congelación y descongelación celular.

Las células se criopreservaron para su mantenimiento en el tiempo y su posterior empleo. Por cada botella de 75 cm² o placa petri de 100 mm de diámetro se empleó un criovial de 1,8 ml estéril. Las células se lavaron 2 veces con PBS estéril y se tripsinizaron. La suspensión celular se recogió en un tubo de 15 ó 50 ml y se centrifugó a 300 xg durante 3 minutos a 4°C. El sobrenadante se decantó, se añadió 1 ml de medio



de cultivo a 4°C sobre el sedimento y se resuspendió unas 35 veces con una micropipeta de 100-1000 µl. Se añadieron al criovial 900 µl de la suspensión celular y otros 900 µl de medio de cultivo suplementado con dimetil sulfóxido (DMSO) diluido en medio de cultivo al 5% a 4°C. El criovial se agitó varias veces para homogeneizar bien la nueva suspensión y se mantuvo, primero, a -80°C durante 24 horas y, a continuación se almacenó en un tanque de nitrógeno líquido.

Para descongelar las células conservadas en nitrógeno líquido, el criovial se introdujo en un baño a 37°C, se agitó en círculos durante unos minutos y se volcó directamente en un tubo de 50 ml con medio de cultivo previamente calentado y basificado a 37°C para sembrar las células en una placa petri de 100 mm de diámetro. A las 24 horas, el medio empleado se reemplazó por medio fresco.

2.3. Expansión del cultivo celular.

Para la expansión del cultivo celular se siguió la metodología recomendada para esta línea celular por la empresa ATCC con algunas modificaciones.

Se realizaron 10 pases 1:6 (P-1 a P-10) (Figura 12). Los 2 primeros pases (P-1 y P-2) se hicieron en botellas de cultivo de 75 cm² y el resto (P-3 a P-10) en placas petri de 100 mm de diámetro. A la vez que se iban realizando los estudios oportunos en cada uno de los pases, las células se fueron congelando en crioviales de 1,8 ml.

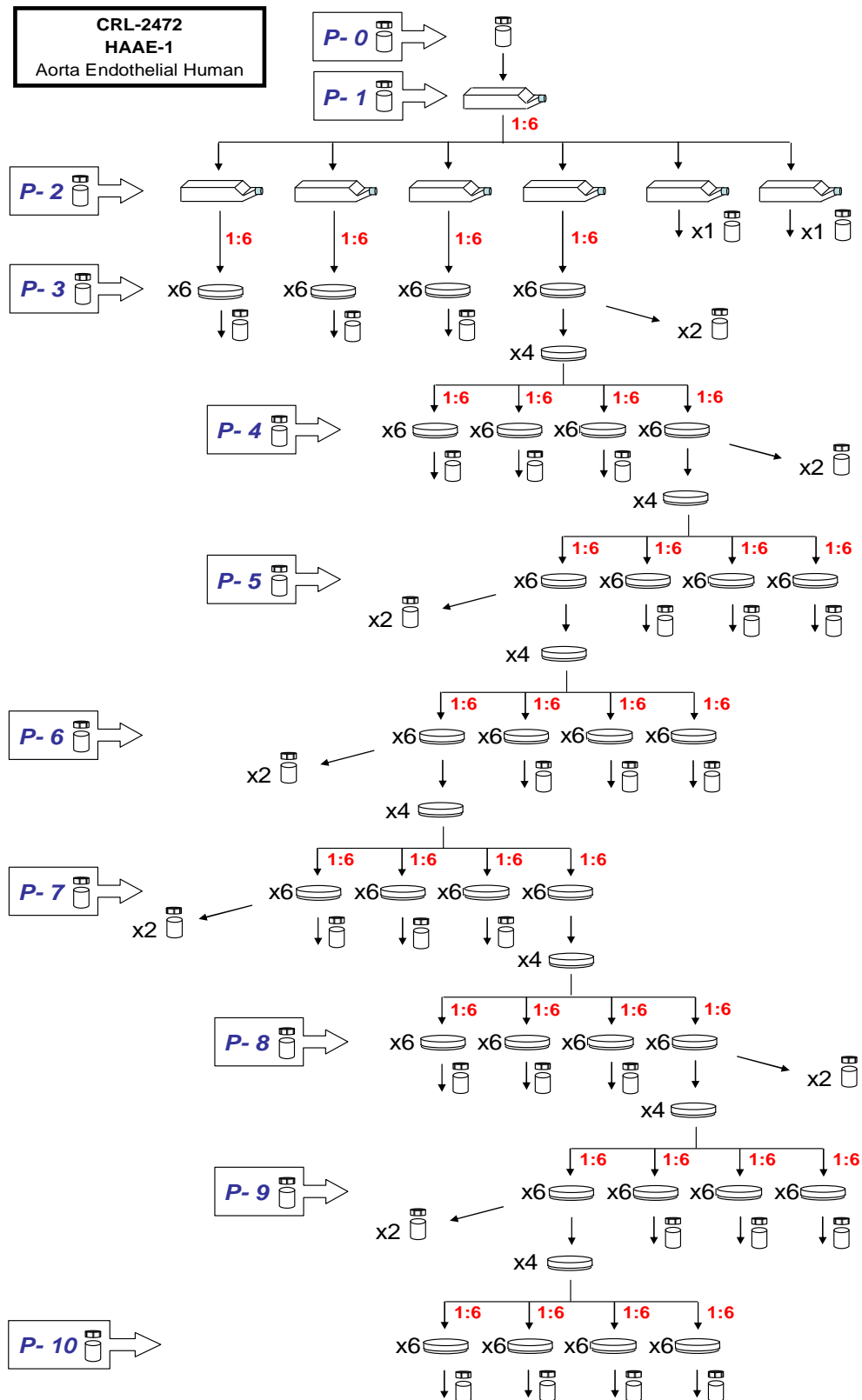


Figura 12. Esquema representativo de la expansión de la línea celular HAAE-1. Pase celular o resiembra (P-). Pase de una a seis placas (1:6).



2.4. Condiciones del cultivo y recogida de muestras.

2.4.1. ELISAs comerciales, Western Blot, ensayo de citotoxicidad, ciclo celular, apoptosis, necrosis y migración celular.

Se sembraron 500.000 y 1.000.000 de células endoteliales en placas petri de 60 y 100 mm de diámetro respectivamente. Se dejaron crecer durante 4 días hasta alcanzar una confluencia del 90% y se trataron con los diferentes antígenos durante 24 horas. Para los ensayos de ELISA y citotoxicidad, el medio de cultivo resultante fue recogido en eppendorfs estériles de 1,5 ml, centrifugado a 300 xg durante 3 minutos a 4°C y conservado a -80°C. En los estudios sobre el ciclo celular se tuvo en cuenta que el volumen final del medio de cultivo por placa a analizar es de 4 ml. Para los estudios de migración se emplearon solamente placas de 60 mm de diámetro.

2.4.2. Inmunofluorescencia.

Se sembraron 50.000 células para analizar la presencia de ICAM-1, VCAM-1 y PECAM-1 y 1.000.000 para la de α -actina sobre un cubreobjetos de vidrio de 20 x 20 mm en 1 ml de medio de cultivo. Los cubreobjetos fueron previamente calentados a 100°C en una estufa y colocados en placas de 6 pocillos o en placas petri de 35 mm de diámetro. Se esperaron 12 horas para que las células se adhirieran a los cubreobjetos y se renovó el medio. Dos días después, las células se trataron durante 24 horas con los antígenos correspondientes. En el caso de α -actina, se practicaron una serie de heridas horizontales y verticales (*Wound Healing*) de un extremo a otro de cada cubreobjetos con una punta estéril de 1 a 10 μ l con el extremo muy fino y los cultivos se trataron durante 4 horas. El marcaje se realizó a las 0 y a las 4 horas.

2.4.3. Permeabilidad a moléculas.

Los insertos (ver apartado 2.10.) se trataron previamente con 100 μ l de gelatina de cerdo 0,1%, durante 10 minutos en un incubador de CO₂ a 37°C. Se succionó la gelatina de cerdo y se sembraron 50.000 células en 200 μ l de medio de cultivo en el compartimiento superior del inserto y se introdujeron 600 μ l de medio en el compartimiento inferior del mismo. Después, se esperaron 12 horas para que diese



tiempo a que las células se adhiriesen a la membrana porosa y confluyesen para, finalmente, ser tratadas durante 24 horas con los distintos antígenos.

2.4.4. Ensayos de proliferación celular mediante la técnica de cristal violeta.

Se sembraron 10.000 células en placas de 24 pocillos. A las 12 horas, las células se lavaron 2 veces con 1 ml de PBS estéril, se les añadió el tratamiento adecuado y se esperaron 0, 2, 4, 6, 8 y 10 días.

2.5. Condiciones de tratamiento de los cultivos celulares.

En los estudios de puesta a punto del modelo experimental *in vitro*, los cultivos confluentes de células endoteliales se trataron durante 24 horas con concentraciones crecientes de DiSA y de WSPr por cada ml de medio de cultivo (Tabla 4). Para el resto de los estudios, los cultivos de células endoteliales se trataron con 1 µg/ml de DiSA y de WSPr durante 24 horas, concentración elegida como ideal para los experimentos posteriores.

DiSA	100 ng	500 ng	1 µg	10 µg	50 µg	100 µg	500 µg
-------------	---------------	---------------	-------------	--------------	--------------	---------------	---------------

WSPr	100 ng	500 ng	1 µg
-------------	---------------	---------------	-------------

Tabla 4. Concentraciones crecientes de DiSA y WSPr con las que se trataron los cultivos de células endoteliales.

2.6. Western blot.

La técnica de Western Blot se basa en la detección de proteínas utilizando anticuerpos específicos, después de separarlas por su peso molecular mediante electroforesis (Winston et al., 1987). La metodología empleada fue la descrita por Jerkic et al. (2006), con algunas modificaciones.



2.6.1. Obtención de extractos de proteínas a partir de cultivos de células endoteliales.

Las placas petri de 60 y 100 mm de diámetro con los cultivos de celulares endoteliales se colocaron en hielo para disminuir su metabolismo. Después, las células adheridas a las placas petri se lavaron 2 veces con 5 ó 10 ml de PBS estéril a 4°C y posteriormente se añadieron 100 y 500 µl de tampón de lisis mezclado con inhibidores de proteasas (1 µl de leupeptina, 1 µl de pepstatina A, 1 µl de aprotinina y 10 µl de fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) 100 mM por cada 1 ml de tampón de lisis) y fosfatasas (5 mg de ortovanadato sódico por cada 1 ml de tampón de lisis) cuando se utilizaron placas petri de 60 y 100 mm de diámetro respectivamente. Dichos inhibidores se añadieron al tampón de lisis en el mismo momento de su empleo. A continuación, las células se levantaron con un rascador y se recogió el extracto celular de cada placa en un eppendorf estéril de 1,5 ml. Finalmente, el lisado se centrifugó a 15.000 xg durante 10 minutos a 4°C y el sobrenadante se almacenó a -80°C.

2.6.2. Cuantificación de proteínas.

Para valorar la concentración de los lisados celulares provenientes de los cultivos de células endoteliales se empleó el kit *DC protein Assay* siguiendo las instrucciones del fabricante. La absorbancia se leyó a 720 nm en un espectrofotómetro. Este método está basado en el método de Lowry (Lowry et al., 1951).

2.6.3. Electroforesis.

Se prepararon geles de poliacrilamida al 8, 10, 12 y 15% con un grosor de 0,75, 1 y 1,5 mm siguiendo la metodología descrita por Laemmli (1970), con algunas modificaciones. Se preparó un gel separador para poder separar las proteínas por su peso molecular y se añadieron unos 2 ml de agua bidestilada o isobutanol para evitar el contacto entre el gel y el aire mientras se polimerizaba. El tiempo aproximado de polimerización fue de 15 minutos. Después se colocó un peine de 9 ó 10 pocillos, con un grosor similar al del gel de separación, y se añadió el gel de carga. La cantidad de muestra de proteína que se cargó en cada pocillo del gel fue siempre de 10 µg, con tampón de carga 4X (proporción 1:3). Las muestras se desnaturalizaron hirviéndolas



durante 3 minutos a 100°C para reducir los puentes disulfuro de las proteínas. Para realizar la electroforesis se empleó el equipo para Western Blot Miniprotean[®] 3. En una cubeta vertical se colocaron los geles ya preparados y se cargaron las muestras con un marcador de peso molecular. La cubeta se rellenó con tampón de electroforesis 1X y se conectó a una fuente de alimentación entre 120-150V, durante aproximadamente 1 hora y media, hasta que el frente llegó hasta el final del gel de electroforesis. Todo el proceso se realizó a 4°C.

2.6.4. Electrotransferencia.

La metodología empleada se basa en la descrita por Towbin et al. (1979). Las proteínas separadas previamente en el gel de electroforesis se transfirieron a una membrana de polivinilidenofluoruro (PVDF). Para ello se preparó un sándwich en tampón de transferencia a 4°C, colocando una esponja y 3 papeles *Whatman* en ambos extremos del sándwich. Posteriormente se activó una membrana PVDF del mismo tamaño que el gel de electroforesis con metanol durante 15 segundos en agitación y se pegó al gel, colocándose ambas en el centro del sándwich. El sándwich se situó dentro de la cubeta de transferencia y todo ello dentro de la cubeta Miniprotean[®] 3. Dicha cubeta se rellenó con tampón de transferencia y se conectó a una fuente de alimentación a 400 mA durante 1 hora y media a 4°C. De esta forma se evitó el calentamiento y la degradación de proteínas.

2.6.5. Bloqueo.

Una vez realizada la transferencia, se realizó un lavado rápido con 10 ml de tampón de lavado en una cubeta y se bloqueó con 20 ml de BSA diluido en el tampón de lavado al 3-4%, dependiendo del anticuerpo (Ac) empleado, durante 1 hora y media. Después se añadió el Ac 1° (Tabla 5) a una dilución adecuada en 20 ml de BSA al 3-4% durante 1 hora y media y se realizaron 3 lavados con 10 ml de tampón de lavado de 7 minutos cada uno. Posteriormente se incubó con el Ac 2° (Tabla 5), diluido convenientemente en 20 ml de BSA al 3-4% durante 30 minutos. Finalmente se repitieron los lavados. Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente o a 4°C en agitación. En este caso, el tiempo de incubación era el de toda la noche.



Proteína	Pm (kDa)	Bloqueo (% BSA)	Ac 1° (dilución)	Ac 2° (dilución)
COX-1 ^{AP}	70	4%	1/1.000 Ac de cabra	1/1.0000 IgG de mono anti-cabra
COX-2 ^{AP}	70-72	4%	1/1.000 Ac de cabra	1/1.0000 IgG de mono anti-cabra
5-LO ^{AP}	80	3 %	1/1.000 Ac de conejo	1/2.0000 IgG de cabra anti-conejo
α -tubulina *	60	3 %	1/5.000 Ac de ratón	1/15.000 IgG de cabra anti-ratón
iNOS ^{AP}	130	3 %	1/1.000 Ac de conejo	1/2.0000 IgG de cabra anti-conejo
eNOS ^{AP}	140	3 %	1/2500 Ac de conejo	1/2.0000 IgG de cabra anti-conejo
E-cadherina	120	3 %	1/1.000 Ac de ratón	1/15.000 IgG de cabra anti-ratón
VEGF ^{AP}	21-42	3 %	1/1.000 Ac de cabra	1/1.0000 IgG de mono anti-cabra
ICAM-1 ^{AP}	85-110	3 %	1/1.000 Ac de cabra	1/1.0000 IgG de mono anti-cabra
VCAM-1 ^{AP}	100-120	3 %	1/1.000 Ac de cabra	1/1.0000 IgG de mono anti-cabra
PECAM-1 ^{AP}	120-132	3 %	1/1.000 Ac de cabra	1/1.0000 IgG de mono anti-cabra
PCNA ^{AP}	36	3 %	1/1.000 Ac de ratón	1/15.000 IgG de cabra anti-ratón

Tabla 5. Proteínas, pesos moleculares, bloqueo con BSA, Ac 1^{os} y 2^{os}, y sus diluciones, para su empleo en la técnica de Western Blot. Todos los Ac 2^{os} están conjugados con HRP. (*) Anticuerpo monoclonal. (^{AP}) Anticuerpo policlonal.

2.6.6. Revelado.

Para detectar la presencia de proteínas marcadas en la membrana de PVDF se usó un método no radiactivo de emisión de luz. El anticuerpo secundario está conjugado con la enzima peroxidasa de rábano (HRP) que cataliza la oxidación del luminol presente en un tampón de revelado, que produce una emisión de luz (quimioluminiscencia). Ésta se detecta mediante la exposición a una película (autorradiografía), siendo la magnitud de la emisión de luz proporcional a la cantidad de proteína presente en la membrana. La membrana se puso en contacto con 8 ml de tampón de revelado durante 1 minuto, después se desechó y la membrana se secó en un papel absorbente *Whatman*. Después la membrana se colocó entre 2 películas



transparentes en un *casette* de revelado y se llevó a una habitación oscura, con luz roja de seguridad, para exponer la película de autorradiografía a la membrana de PVDF durante el tiempo necesario. Finalmente se reveló en una máquina de revelado convencional.

2.6.7. Análisis de las bandas.

Las películas autorradiografiadas se digitalizaron y las imágenes se analizaron mediante el programa informático *Adobe Photoshop CS*. La intensidad de las bandas detectadas en el proceso de revelado se cuantificó mediante el programa *Scion Image* (Scion Corporation).

2.6.8. *Stripping*.

Para reutilizar las membranas se empleó un tampón de *Stripping* para poder eliminar los anticuerpos de la membrana de PVDF. Si dicha membrana estaba seca, se activó durante 15 segundos en un volumen suficiente de metanol absoluto para cubrir la membrana. Después se realizó un lavado rápido con 10 ml de tampón de lavado y se puso en contacto con 10 ml de una solución de *stripping* 1X diluida en agua bidestilada, durante 15 minutos en agitación. Cuando se realizó un segundo o tercer *stripping* el tiempo de incubación fue mayor. Finalmente se realizó un último lavado rápido con tampón de lavado y se continuó con el protocolo del Western Blot.

2.7. Ensayos de citotoxicidad.

Se empleó el kit comercial *Toxilight® BioAssay* para analizar el efecto citotóxico de los diferentes tratamientos empleados sobre los cultivos de células endoteliales. Esta técnica se basa en la cuantificación por bioluminiscencia de la liberación de la adenilato quinasa desde células con sus membranas plasmáticas dañadas o que hayan perdido su integridad (Crouch et al., 1993). Primero se reconstituyó el reactivo *AK Detection Reagent* en *Assay Buffer* y se dejó 15 minutos para que se rehidratase el reactivo. Luego se recogieron 2 y 5 ml de medio de cultivo procedente de placas petri de 60 y 100 mm respectivamente, 5 minutos antes de comenzar el análisis y se depositaron en hielo. En un tubo de policarbonato se añadieron 20 μ l del medio de cultivo recogido y 100 μ l de



AK Detection Reagent, se esperaron 5 minutos y se analizó en un luminómetro. Éste se programó para que se leyera cada muestra durante un segundo. El grado de citotoxicidad se expresó en unidades de luz relativas (URL).

2.8. ELISA para la detección de óxido nítrico (NO).

Se empleó el kit comercial *ParameterTM Total NO/Nitrite/Nitrate Immunoassay* para la detección de nitritos y nitratos en el medio de cultivo de células endoteliales siguiendo las indicaciones del fabricante. Todas las muestras se analizaron a una dilución 1:5 y por duplicado. La absorbancia de las muestras se leyó a una D.O. de 540 nm en un espectrofotómetro con un filtro de corrección de 690 nm.

2.9. Inmunofluorescencia.

Es un método inmunocitoquímico para la localización de proteínas celulares. Se emplean un anticuerpo primario y otro secundario conjugado con un fluorocromo, que emite fluorescencia cuando es excitado con una lámpara de ultravioleta, reaccionan con una proteína específica y se visualiza (Biswas et al., 2006).

2.9.1. Marcaje celular de ICAM-1, VCAM-1 y PECAM-1.

Las células endoteliales se sembraron en un cubreobjetos de vidrio de 20 x 20 mm, se lavaron 2 veces con 2 ml de PBS estéril y se fijaron con 2 ml de formaldehído al 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se retiró el formaldehído al 4%, se realizaron 2 lavados y se guardaron con PBS a 4°C hasta ser procesados. Después se añadieron 50 µl del anticuerpo correspondiente a una dilución 1:25 en BSA, diluido en PBS al 0,1%, sobre parafilm, en una caja ambiente húmedo (Tabla 6). Cada cubreobjetos se volvió a lavar con PBS y se colocó la cara del cubreobjetos con las células fijadas sobre los 50 µl del anticuerpo correspondiente diluido previamente durante una hora a temperatura ambiente. Como control negativo se utilizaron 50 µl de BSA al 0,1%. A continuación se añadieron 50 µl del anticuerpo secundario correspondiente diluido en BSA 0,1% a 1:500 sobre parafilm en otra caja húmeda. Luego, la cara del cubreobjetos con las células fijadas se lavó con 500 µl de PBS y después se sumergieron los cubreobjetos, primero en PBS y luego en BSA al



0,1% unos segundos, para después añadir 50 μ l del anticuerpo secundario correspondiente durante una hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente, se sumergieron los cubreobjetos con las células fijadas en una placa de 35 mm en 3 ml de agua bidestilada y 1 μ l de *Hoestch* 33258 (10 mg/ml) para teñir los núcleos de las células y poder localizarlas. Por último, los cubreobjetos se sumergieron en PBS, se secaron y se montaron en un portaobjetos, al que previamente se le había añadido una gota de Prolong® *Antifade Reagent*, para guardarlo finalmente en oscuridad a 4°C.

2.9.2. Marcaje celular de COX-2.

El procedimiento fue similar al del aparatado anterior pero, en este caso, la membrana de las células se permeabilizó para que pudiesen entrar los anticuerpos. Después de haber fijado las células con 1 ml de formaldehído al 4% y haberlas lavado con 1 ml de PBS, se añadió 1 ml de metanol absoluto, enfriado previamente a -20°C, a la cara del cubreobjetos en donde estaban las células fijadas durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después, los cubreobjetos se lavaron con PBS y se prosiguió con el protocolo descrito en el aparatado anterior.

2.9.3. Marcaje celular de α -actina.

Las células sembradas en cubreobjetos de vidrio se lavaron 2 veces con 2 ml de PBS estéril a temperatura ambiente y se fijaron con 1 ml de paraformaldehído al 4% durante 15 minutos. Se realizaron otros 2 lavados con PBS estéril y se permeabilizaron con 2 ml de un tampón de permeabilización durante 5 minutos. Se retiró el tampón y se añadió 1 ml de *Quench* NH_4Cl 50 mM durante 5 minutos. Después se lavaron 2 veces con 2 ml de tampón de permeabilización y sobre una caja húmeda envuelta en papel albal, se colocaron sobre el parafilm 50 μ l de Alexa 546 Phalloidina 10U por cubreobjetos. A continuación, se colocaron las células fijadas en cada cubreobjetos sobre los 50 μ l de Alexa 546 Phalloidina 10U durante 20 minutos a 4°C en oscuridad (Tabla 6). Los cubreobjetos se lavaron 3 veces con 2 ml de tampón de permeabilización y después, en una placa de 35 mm, se sumergieron los cubreobjetos con las células fijadas en 3 ml de agua bidestilada y 1 μ l de *Hoestch* 33258 (10 mg/ml) para teñir los



núcleos de las células y poder localizarlas. Por último, los cubreobjetos se montaron en unos portaobjetos a los que previamente se le había añadido una gota de Prolong® *Antifade Reagent*, para guardarlo finalmente en oscuridad a 4°C.

Proteína	Ac 1° (dilución)	Ac 2° (dilución)
COX-2 ^{AP}	1/25 Ac de cabra	1/500 IgG de mono anti-cabra Alexa Fluor® 488
ICAM-1 ^{AP}		
VCAM-1 ^{AP}		
PECAM-1 ^{AP}		
α-actina	Alexa 546 Phalloidina 10U	

Tabla 6. Anticuerpos empleados en la técnica de inmunofluorescencia. (^{AP}) Anticuerpo policlonal.

2.9.4. Análisis de las muestras.

Después de marcar las moléculas se realizaron fotografías mediante un microscopio invertido de fluorescencia con los objetivos de 5, 10 y 20X y se procesaron mediante el programa Axiovision Release 4.5.

2.10. Permeabilidad a moléculas.

Se analiza la capacidad que posee una monocapa de células para retener moléculas. Cuanta menor sea la cantidad de la molécula que se obtenga tras su paso por la monocapa de células, la permeabilidad será menor (Rodríguez et al., 2002).

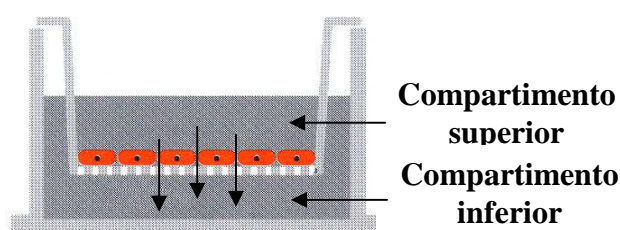


Figura 13. Esquema de un inserto *Transwell* para los estudios de permeabilidad a moléculas.



En insertos de poliéster *Transwell* con un tamaño de poro de 3 μm y un área de 0,33 cm^2 en placas de 24 pocillos, se formó una monocapa confluyente de células endoteliales (Figura 13) y se sustituyó el medio de cultivo del compartimento superior de cada inserto por 200 μl de una solución FITC-dextrano Mr 40.000 10 $\mu\text{mol/L}$ diluido en 15 ml de medio de cultivo a 37°C, conservado previamente en oscuridad absoluta.

Del compartimento inferior de cada inserto se recogieron 50 μl de medio de cultivo nada más añadir el medio con el FITC-dextrano diluido, a los 30 minutos, y a la 1, 2, 4, 6, 12 y 24 horas después del inicio del experimento. Estos 50 μl se fueron sustituyendo con otros 50 μl de medio fresco. Las medidas de fluorescencia de los controles y de las muestras se midieron en el mismo momento en un fluorímetro con un filtro de excitación a 485 nm y otro de emisión a 538 nm.

2.11. Ensayos de proliferación celular mediante la técnica de cristal violeta.

Esta técnica se fundamenta en la capacidad que tiene el colorante cristal violeta de fijarse a los núcleos celulares, de manera que puede establecerse una relación directa entre el número de células viables y la cantidad de cristal violeta fijado (Drysdale et al., 1983).

Esta técnica se empleó para el estudio de la proliferación celular a lo largo de 10 días. A los 2 días, las células se lavaron 2 veces con 1 ml de PBS y se fijaron con 1 ml de formaldehído al 4% durante 10 minutos. Se lavaron de nuevo 2 veces con 1 ml de PBS estéril y se tiñeron los núcleos de las células con 300 μl de cristal violeta al 0,2% y se esperaron 30 minutos en oscuridad. Después se lavaron exhaustivamente con PBS estéril hasta que no quedaron restos de cristal violeta y se dejaron secar durante una noche en oscuridad. Finalmente, se añadieron 2 ml de ácido acético al 10% para decolorar los núcleos, se homogeneizó entre 3 y 4 veces y se leyó la absorbancia de cada muestra a 595 nm en un espectrofotómetro. Tanto el cristal violeta al 0,2% y el ácido acético al 10% se filtraron con un filtro de 0,45 μm antes de ser empleados. Este procedimiento se repitió a los 4, 6, 8 y 10 días después de ser tratadas correspondientemente.



Realizamos, además, una curva patrón para determinar el número de células que corresponden a una determinada absorbancia. Se sembraron cantidades crecientes de células (0, 1.000, 2.000, 5.000, 10.000, 20.000, 30.000, 40.000 y 50.000) en placas de 24 pocillos y, a las 24 horas, se tiñeron siguiendo la misma metodología.

2.12. Determinación del ciclo celular.

Este método está basado en la detección de células proliferantes (o en fase S+G₂M) y quiescentes (o en fase G₀G₁) mediante un marcador detectable por citometría de flujo (Koopman et al., 1994; Vermes et al., 1995).

Primero se recolectaron 4 ml de medio de los cultivos de células endoteliales. Después, las células se lavaron 2 veces con 10 ml de PBS estéril, se añadió 1 ml de solución tripsina/EDTA que se mezcló con 5 ml de un tampón PBS CM estéril una vez despegadas las células. Los 6 ml resultantes se introdujeron en tubos de 10 ml de policarbonato en hielo y, posteriormente, se añadieron los otros 4 ml de medio recolectado. La suspensión resultante se centrifugó durante 5 minutos a 600 xg a 4°C y el sobrenadante se fue desechó. A continuación, las células sedimentadas se resuspendieron en 500 µl de etanol al 50%, pipeteando 35 veces, y se almacenaron a -20°C hasta que fueron analizadas por citometría de flujo en el servicio de citometría de la Universidad de Salamanca. Los datos se obtuvieron mediante el programa informático *Cell Quest* (Becton Dickinson) y el análisis de los resultados se realizó mediante el programa *ModFitLT* (Verita Software).

2.13. Determinación de la apoptosis y necrosis celular.

Esta técnica se fundamenta en la detección de ADN libre de células muertas mediante yoduro de propidio y la de fosfolípidos de membrana procedentes de células apoptóticas con anticuerpos de Anexina-V (Koopman et al., 1994; Vermes et al., 1995).

Las células endoteliales se lavaron con 10 ml de PBS estéril a 4°C, y despegadas con un tampón de tripsina/EDTA. A continuación se centrifugaron a 300 xg durante 10 minutos a 4°C para eliminar el sobrenadante y se resuspendieron con 10 ml de PBS estéril a 4°C para, finalmente, volverlas a centrifugar. Después se procedió a contar el número de células y, aproximadamente, 1.000.000 de células se resuspendieron en 1 ml



de la solución *Annexin Binding* y se almacenaron a 4°C hasta que fueron procesadas. Las células se analizaron en el servicio de citometría de la Universidad de Salamanca mediante citometría de flujo a una fluorescencia de emisión de 530 nm y fueron separadas en 3 grupos: células vivas (bajo nivel de fluorescencia), apoptóticas (fluorescencia verde moderada), y necróticas (fluorescencia verde de alta intensidad).

2.14. Ensayos de migración.

Con una punta de pipeta estéril de 10 a 100 µl con el extremo prolongado y muy fino se hicieron heridas horizontales y verticales (*Scratches* o *Wound Healing*) de un extremo a otro de cada placa petri de 60 mm de diámetro. Después, las células endoteliales se lavaron con PBS estéril para eliminar las células levantadas o muertas y se añadió medio de cultivo con o sin el tratamiento durante 6 horas. En ese período de tiempo, se realizó una fotografía cada media hora utilizando un microscopio invertido de contraste de fases con un objetivo de 20X, y se observó el tiempo real que tardaba en cerrarse la *herida* para poder elegir un tiempo óptimo en el que realizar los estudios de migración de las células endoteliales.

Sobre cultivos confluentes de células endoteliales mantenidos en placas petri de 60 mm se realizaron heridas similares a las del apartado anterior y se les añadió el tratamiento durante 4 horas. Se hicieron 120 fotos en diferentes puntos de las placas justo después de realizar la herida y en esos mismos puntos, transcurridas 4 horas, con una cámara digital acoplada a un microscopio invertido de contraste de fases con el objetivo de 10 y 20X (Figura 14).

En cada fotografía, se midió el espacio entre los 2 frentes celulares (distancia de migración) producido por la herida en 2 puntos de cada foto. Después se restó la distancia inicial de la herida (0 horas) de la final (4 horas) en cada uno de los puntos y se realizaron las medias. Todos los puntos que se emplearon para el estudio tenían distancias iniciales similares.

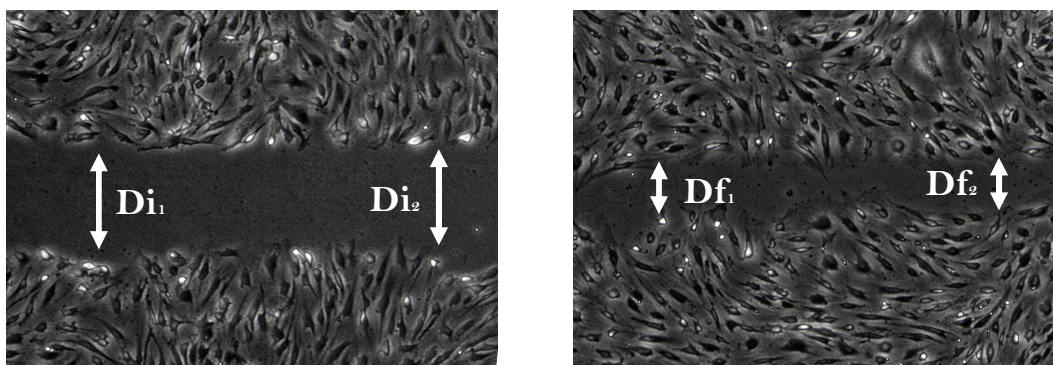


Figura 14. Distancia de las heridas producidas en las células endoteliales por *Wound Healing*. En cada foto se midió la distancia de las heridas entre los dos frentes celulares en ambos extremos de cada foto nada más realizar la herida (Di_1 y Di_2) y a las 4 horas (Df_1 y Df_2). La distancia de migración da en cada uno de los puntos se calculó restando la distancia final de la inicial de cada punto ($Di_1 - Df_1$ y $Di_2 - Df_2$).

3. Análisis estadísticos.

En los estudios sobre la presencia de eicosanoides en perros y humanos se empleó el test no paramétrico de *Kruskal-Wallis* para poder realizar comparaciones múltiples entre las absorbancias obtenidas, y el test de *Dunn* para analizar muestras pareadas. En los estudios en gatos también se empleó el test no paramétrico de *Kruskal-Wallis* y las muestras pareadas fueron analizadas con el test de *Wilcoxon*. Todas las muestras se analizaron por duplicado.

En los estudios realizados en cultivos de células endoteliales, cuando se analizaron más de 2 grupos de datos, el análisis estadístico se llevó a cabo mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de una vía. Si resultaba con diferencias significativas, las medidas de los grupos eran evaluadas mediante un *post hoc* usando el test de *Bonferroni*. Cuando se analizó el análisis estadístico solamente entre 2 grupos, se empleó el test estadístico de la *t* de *Student*.

En todos los resultados se consideró que existían diferencias significativas si el *p* valor era menor de 0,05 y 0,01 ($p < 0,05$ y $p < 0,01$ respectivamente) para un nivel de confianza del 95 y del 99 % respectivamente. Todos los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media (E.E.M.) de, al menos, 3 veces por experimento y grupo.

El programa informático empleado para realizar todos los análisis estadísticos fue el SPSS 15.0 (*Statistical Package for the Social Sciences*).



1. Clasificación de los hospedadores incluidos en el estudio *in vivo*.

En primer lugar se seleccionaron las muestras de suero d hospedadores infectados natural y experimentalmente, con arreglo a los criterios indicados en el apartado 1.3. de Materiales y Métodos.

1.1. Perros.

En la Tabla 7 se recogen los resultados de los análisis de las 178 muestras de perros que inicialmente se incluyeron en el estudio.

1.- De los 143 perros procedentes de zona endémica, 20 presentaron positividad al test de antígenos circulantes de *D. immitis* IDEXX (test IDEXX), al test de Knott (2200-4300 microfilarias/ml de sangre) y al ELISA de anticuerpos contra *Wolbachia* (ELISA anti-WSPr). Todos ellos presentaban síntomas leves como disnea, taquicardia y tos y se clasificaron como perros microfilarémicos (mf+).

Otros 43 resultaron positivos al test IDEXX y negativos al test de Knott y al ELISA de anticuerpos contra WSPr, excepto 5 en los que se obtuvo una respuesta positiva en este último. Ninguno de los perros analizados había sido sometido a tratamiento filaricida alguno, por lo que la carencia de microfilarias se consideró de origen inmune. Tampoco manifestaban ningún tipo de síntomas relacionados con la dirofilariosis cardiopulmonar canina, a excepción de un animal que ingresó en la clínica veterinaria en fase premortal, con gravísimos embolismos pulmonares, que le causaron la muerte pocas horas después. En éste último también se obtuvo respuesta de anticuerpos positiva a *Wolbachia*. Todos ellos se clasificaron como perros con infecciones amicrofilarémicos (mf-). El perro en fase premortal no fue seleccionado para el estudio.

Los 80 perros restantes fueron negativos al test IDEXX, al test de Knott y al ELISA anti-WSPr. Además, ninguno de ellos presentó síntomas relacionados con la dirofilariosis canina y/o con alguna otra enfermedad, por lo que se les clasificó como animales sanos.

2.- En último lugar, todos los perros procedentes de una zona no endémica (35) resultaron negativos a todos los test y no presentaban síntomas relacionados con la dirofilariosis. Por todo ello se les clasificó como perros sanos.

Perros	Test IDEXX*	Test Knott (mf/ml)	ELISA Acs anti-WSPr	Clasificación
20	Moderado	2200-4300	Positivo	Microfilarémicos
37	Moderado	Positivo	Negativo	Amicrofilarémicos
6	Moderado/Alto	Negativo	Positivo	Amicrofilarémicos
80	Negativo	Negativo	Negativo	Sanos
35	Negativo	Negativo	Negativo	Sanos

Tabla 7. Clasificación de perros procedentes de zona endémica y no endémica de dirofilariosis según los datos clínicos y serológicos obtenidos en el laboratorio. *Dependiendo de la coloración resultante se consideraron tres niveles: bajo, moderado y alto.

Consecuentemente, para el estudio de eicosanoides en perros se emplearon los siguientes sueros:

G₁.- 20 muestras de perros microfilarémicos procedentes de zona endémica.

G₂.- 37 muestras de perros amicrofilarémicos, con ELISA anti-WSPr negativo procedentes, también, de zona endémica.

G₃.- 20 muestras de individuos sanos procedentes de zona no endémica. Estos se emplearon como control en el estudio.

1.2. Gatos.

Se analizaron 114 muestras de suero de gatos, que se clasificaron de la siguiente manera:

1.- De los 65 gatos procedentes de zona endémica, 20 resultaron positivos al test de anticuerpos contra *D. immitis* (test Heska), al ELISA anti-WSPr, presentaban ecocardiografía positiva y una sintomatología característica de la dirofilariosis felina. A todos ellos se les clasificó como gatos infectados naturalmente. Cinco de los 65 gatos presentaron el test Heska positivo, la respuesta de anticuerpos contra *Wolbachia*

negativa y no presentaban ninguna sintomatología. Además, otros 7 gatos resultaron negativos al test Heska, positivos al ELISA anti-WSPr y tampoco presentaban síntomas. Ni en estos, ni en los 5 anteriores se obtuvieron datos mediante ecocardiografía. Ninguno de ellos fue seleccionado para el estudio.

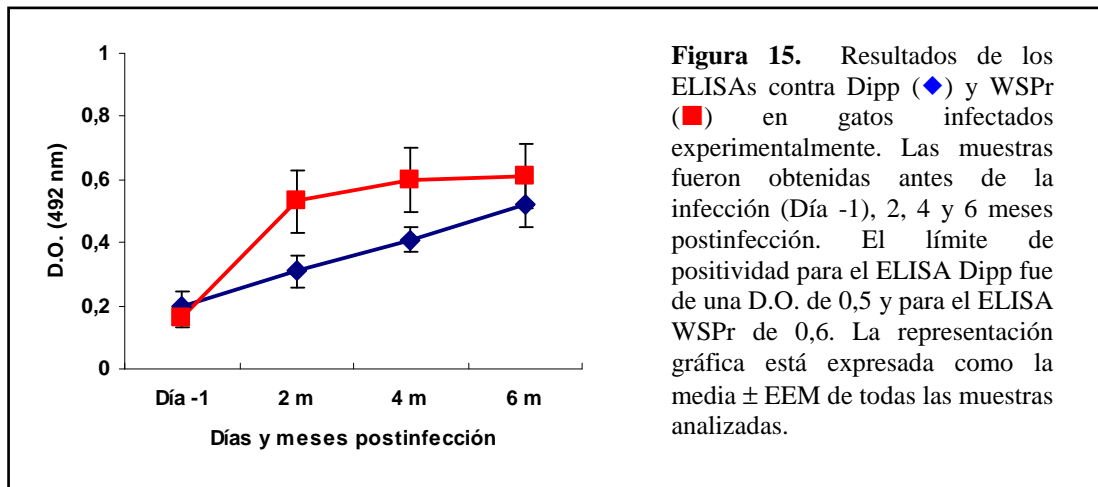
En el resto de los gatos (33) no se detectó presencia de anticuerpos circulantes contra *D. immitis*, ni contra *Wolbachia* (test Heska y ELISA anti-WSPr negativos) y no presentaban ningún tipo de síntoma relacionado con alguna enfermedad por lo que se les clasificó como gatos sanos (Tabla 8).

2.- Todos los gatos de zona no endémica (30) resultaron negativos a todos los test empleados y ninguno de ellos presentaba síntomas relacionados con la dirofilariosis felina. Por estas razones se clasificaron a todos ellos como gatos sanos (Tabla 8).

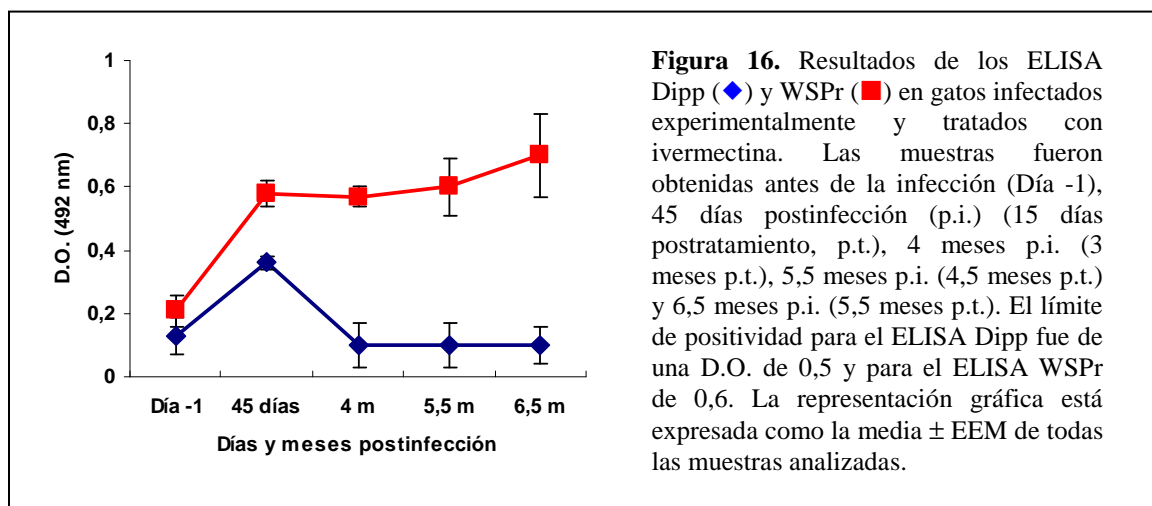
Gatos	Test Heska	ELISA Acs anti-WSPr	Ecocardiografía	Clasificación
20	Positivo	Positivo	Positiva	Gatos infectados naturalmente
5	Positivo	Negativo	?	Sin clasificar
7	Negativo	Positivo	?	Sin clasificar
63	Negativo	Negativo	?	Gatos sanos

Tabla 8. Clasificación de los gatos muestreados en zonas endémicas y no endémicas según los test diagnósticos, los resultados serológicos obtenidos en el laboratorio y los datos clínicos aportados por los veterinarios.

3.- La respuesta de anticuerpos IgG contra *D. immitis* y *Wolbachia* (ELISA anti-Dipp y anti-WSPr respectivamente) fue seguida durante 6 meses en 10 gatos infectados experimentalmente (Figura 15). Al inicio de la infección la respuesta de anticuerpos contra *D. immitis* y contra *Wolbachia* fue muy baja (D.O. media de 0,2). Los anticuerpos IgG anti-WSPr se incrementaron fuertemente a los 2 meses postinfección (p.i.). A partir de este momento y hasta el final del experimento (6 meses p.i.), los anticuerpos anti-WSPr experimentaron un progresivo aumento. A su vez, los anticuerpos anti-Dipp se vieron también incrementados, de forma más lenta, desde el inicio del estudio hasta alcanzar niveles cercanos a los anticuerpos anti-WSPr.



4.- También se analizó la respuesta de anticuerpos IgG contra *D. immitis* y *Wolbachia* mediante la técnica de ELISA (ELISA anti-Dipp y ELISA anti-WSPr, respectivamente) en los 9 gatos infectados experimentalmente y tratados 45 días después con ivermectina (Figura 16). Los anticuerpos anti-WSPr sufrieron un drástico incremento a los 45 días p.i (15 días postratamiento, p.t.) mientras que los anticuerpos anti-Dipp también se incrementaron pero en menor medida. Desde los 4 meses p.i. (3,5 meses p.t.) y hasta el final del estudio, las IgG anti-Dipp presentaron niveles similares previos a la infección y se mantuvieron así hasta el final del experimento. Sin embargo, los niveles de IgG anti-WSPr siguieron aumentando lentamente hasta los 6,5 meses p.i. (5,5 meses p.t.).



Teniendo en cuenta estos resultados se incluyeron en el estudio los siguientes individuos:

G₁.- 20 gatos infectados naturalmente procedentes de zona endémica.

G₂.- 20 gatos sanos procedentes de zona no endémica, que se emplearon como control del estudio.

G₃.- 10 gatos infectados experimentalmente a lo largo de 6 meses.

G₄.- 9 gatos infectados experimentalmente y tratados a lo largo de 6,5 meses.

1.3. Humanos.

Se analizaron inicialmente 383 muestras de suero de personas con las siguientes características, cuyos resultados aparecen en la Tabla 9:

1.- Muestras de suero de 10 pacientes diagnosticados con dirofilariosis pulmonar mediante histología. Fueron cedidas por el Dr. Patrick Lammie del *Center for Diseases Control and Prevention* (CDC) de Atlanta (USA). Además, en todas las muestras se detectó la presencia de anticuerpos positiva a *D. immitis* y contra *Wolbachia*.

2.- De las 326 muestras de suero recibidas de personas residentes en zona endémica, en 125 se detectó respuesta de anticuerpos solamente a *D. immitis*, en 16 únicamente a *Wolbachia* y en el resto (185) a ninguno de los dos antígenos. Además, ninguna de las 326 personas presentaba síntomas relacionados con la dirofilariosis pulmonar ni con alguna otra enfermedad. Los individuos con respuesta de anticuerpos positiva a *D. immitis* se clasificaron como seropositivos sanos; los individuos con ambas respuestas negativas se clasificaron como sanos y los que resultaron únicamente con respuesta positiva a *Wolbachia* no se emplearon en el estudio (sin clasificar).

3.- Finalmente, no se detectó la presencia de anticuerpos frente a *D. immitis* ni a *Wolbachia* en ninguno de los 47 sueros procedentes de zona no endémica y además, tampoco presentaban síntomas relacionados con la dirofilariosis pulmonar. Por este motivo, todos ellos se clasificaron como individuos sanos.

Humanos	Histología	ELISA de Acs Dipp WSPr		Clasificación
10	Positiva	Positivo	Positivo	Dirofilariosis pulmonar
125	?	Positivo	Negativo	Seropositivos sanos
16	?	Negativo	Positivo	Sin clasificar
185	?	Negativo	Negativo	Sanos
47	?	Negativo	Negativo	Sanos

Tabla 9. Clasificación de los humanos muestreados en zonas endémicas y no endémicas de dirofilariosis según los datos clínicos aportados por el personal sanitario y los resultados serológicos obtenidos en el laboratorio.

En el estudio de los eicosanoides se emplearon 80 muestras:

G₁.- 10 muestras de individuos seropositivos con dirofilariosis pulmonar.

G₂.- 40 muestras de individuos seropositivos sanos procedentes de zona endémica.

G₃ - 30 muestras de individuos sanos procedentes de zona no endémica que se emplearon como control del estudio.

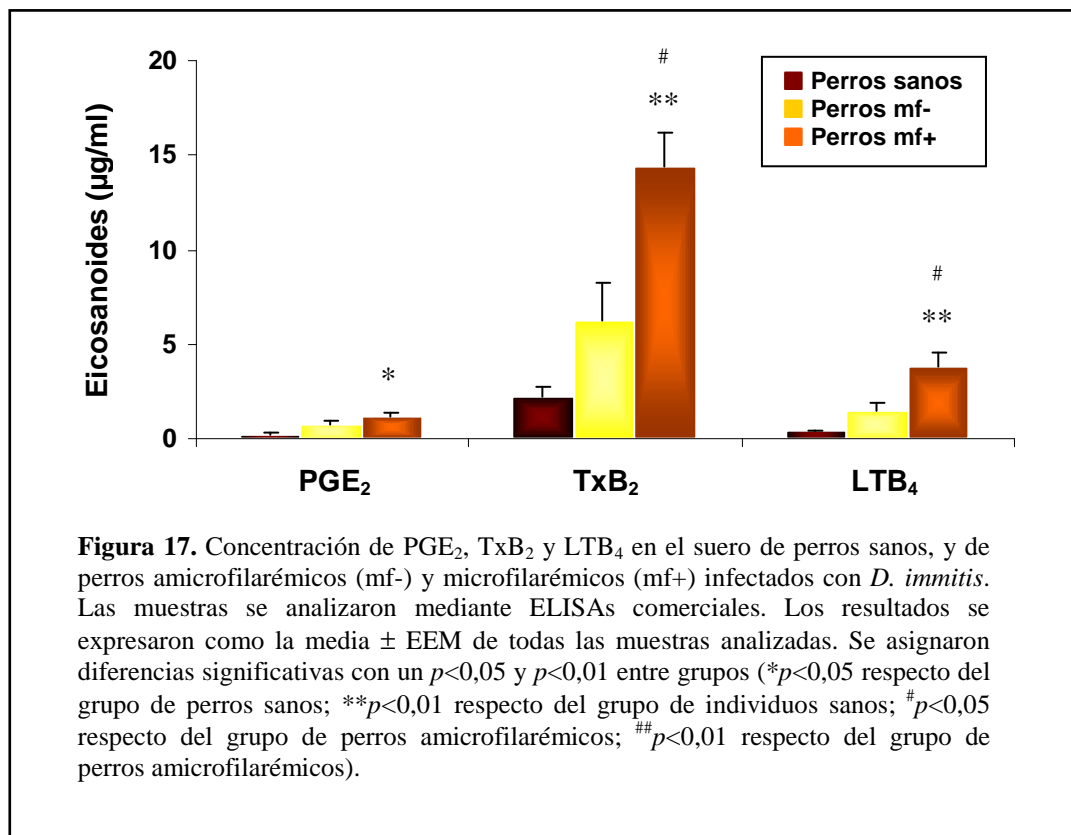
2. Mediadores inflamatorios en hospedadores con dirofilariosis. Análisis de eicosanoides.

Se analizó la presencia de prostaglandina E₂ (PGE₂), tromboxano B₂ (TxB₂) y leucotrieno B₄ (LTB₄), mediante ELISAs comerciales, en el suero de perros, gatos y humanos infectados por *D. immitis* y en individuos sanos empleados como control.

2.1. Eicosanoides en perros.

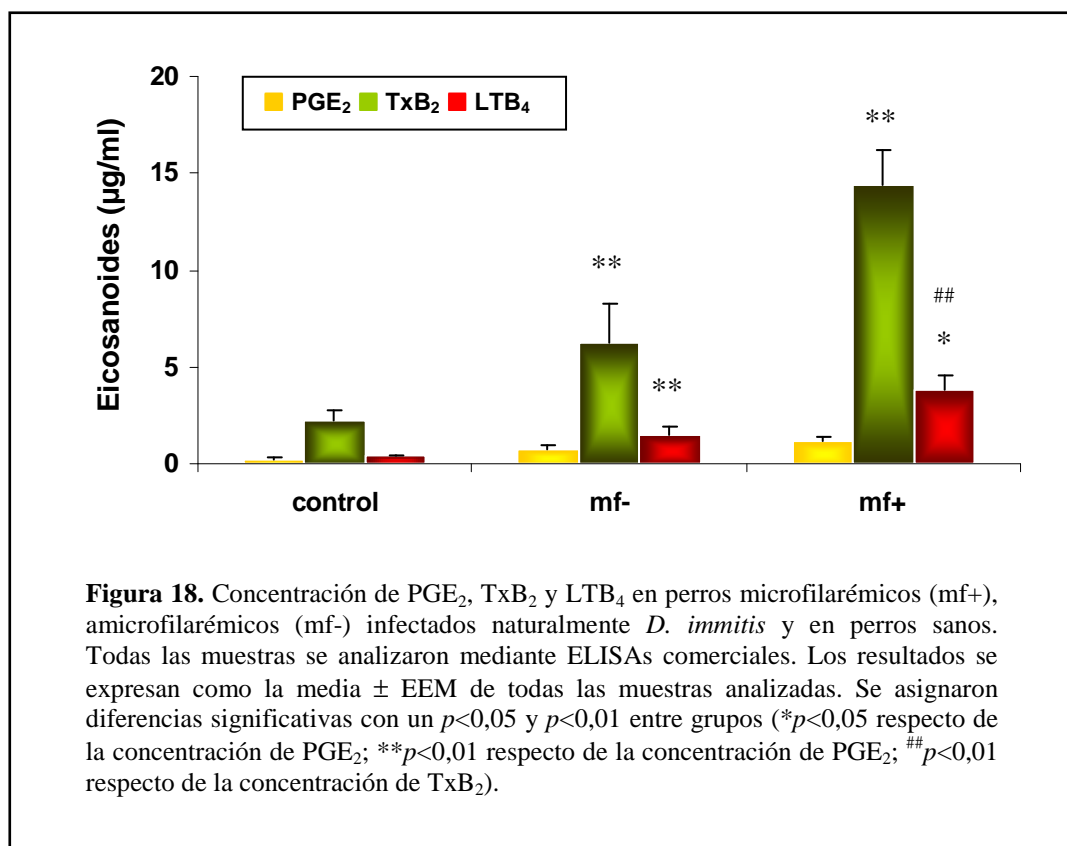
La presencia de los 3 eicosanoides se analizó en perros microfilarémicos, amicrofilarémicos y en perros sanos (Figura 17). Los valores de PGE₂ fueron significativamente más elevados en los perros microfilarémicos que en los perros sanos ($p < 0,05$). No se detectaron diferencias significativas entre los perros amicrofilarémicos y los perros microfilarémicos y los sanos. La presencia de TxB₂ fue significativamente mayor en los perros microfilarémicos que en los perros amicrofilarémicos ($p < 0,05$) y en los perros sanos ($p < 0,01$). No se encontraron diferencias significativas entre los perros

amicrofilarémicos y los sanos. En relación con el LTB_4 , los valores en perros microfilarémicos fueron significativamente superiores a los de los perros amicrofilarémicos ($p<0,05$) y a los perros sanos ($p<0,01$). Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas entre los perros amicrofilarémicos y los perros sanos aún existiendo un aumento moderado de los valores de LTB_4 en los primeros.



Se compararon, además, los valores obtenidos de los eicosanoides en cada grupo de perros (Figura 18). En todos los grupos, los valores de TxB_2 fueron los más elevados. En los perros microfilarémicos existen diferencias significativas entre el TxB_2 y la PGE_2 y el LTB_4 ($p<0,01$ en ambos casos). También se observaron diferencias significativas entre el LTB_4 y PGE_2 ($p<0,05$). En los perros amicrofilarémicos, sólo se observó una diferencia significativa entre los valores de TxB_2 por una parte y de PGE_2 y LTB_4 por otra ($p<0,05$ en ambos casos). En los perros sanos no se observaron diferencias

significativas entre ninguno de los eicosanoides, pero sí existía un aumento moderado del TxB_2 .



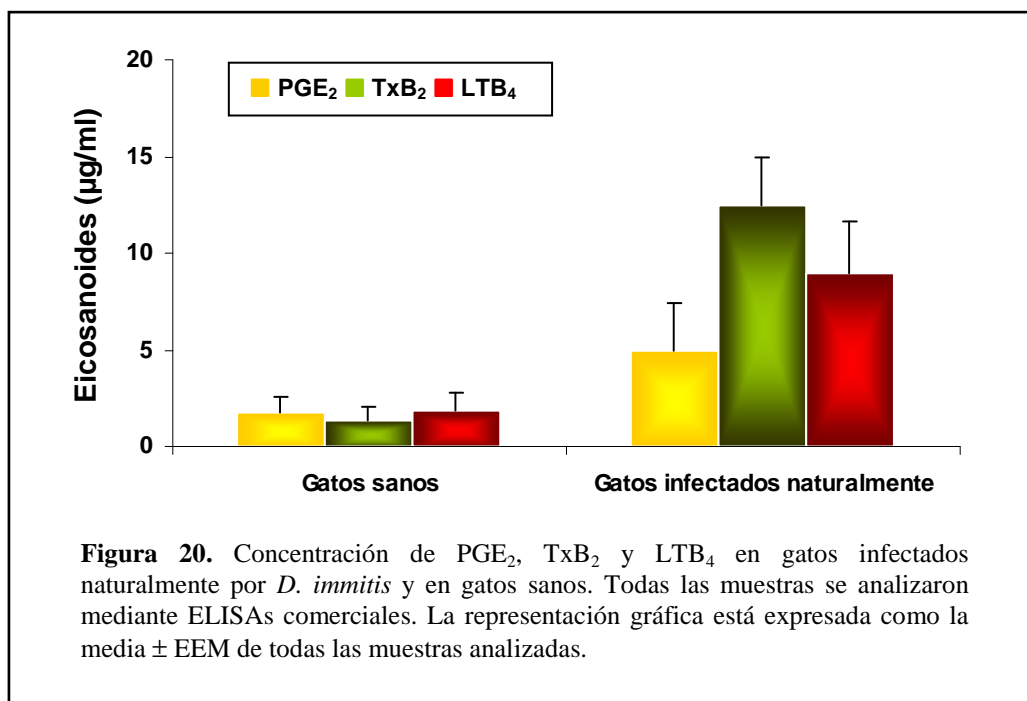
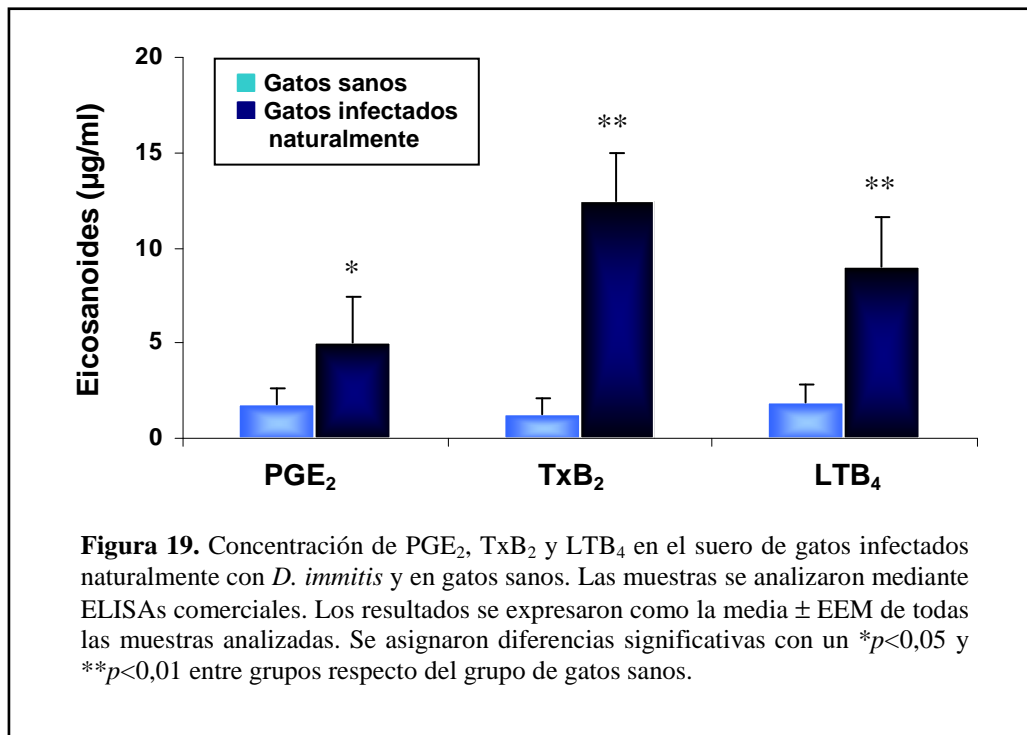
2.2. Eicosanoides en gatos.

2.2.1. Gatos infectados naturalmente.

Se analizó la presencia de PGE_2 , TxB_2 y LTB_4 entre gatos infectados naturalmente por *D. immitis* y gatos sanos (Figura 19). Los gatos infectados naturalmente presentaban valores significativamente más altos que los encontrados en los gatos sanos, tanto de PGE_2 ($p < 0,05$) como de TxB_2 y LTB_4 ($p < 0,01$ en ambos casos).

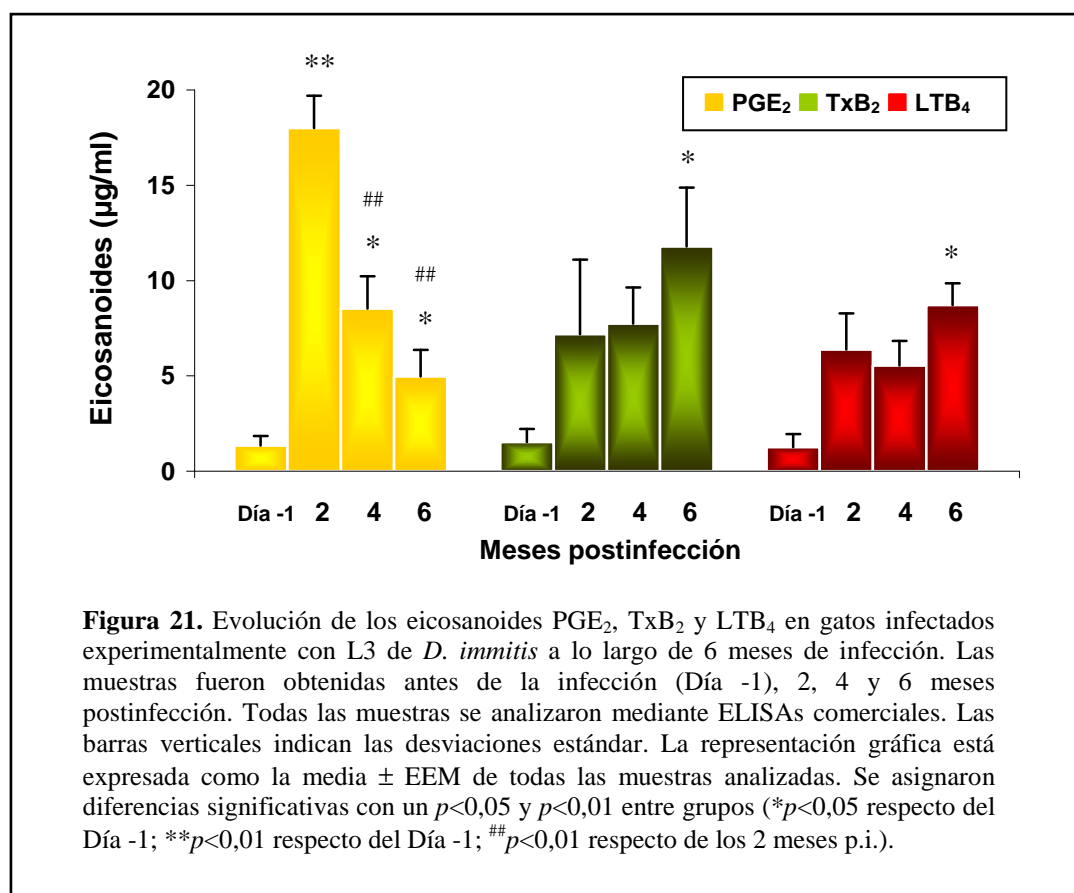
También se analizaron los valores obtenidos de los 3 eicosanoides en cada uno de los grupos de los gatos estudiados (Figura 20). En gatos infectados naturalmente, el TxB_2 fue el eicosanoide con los valores más elevados, seguido del LTB_4 y de la PGE_2 . No se encontraron diferencias significativas entre ninguno de ellos. En los gatos sanos

tampoco se detectaron diferencias significativas entre los 3 eicosanoides estudiados siendo la media de todos sus valores muy similares.



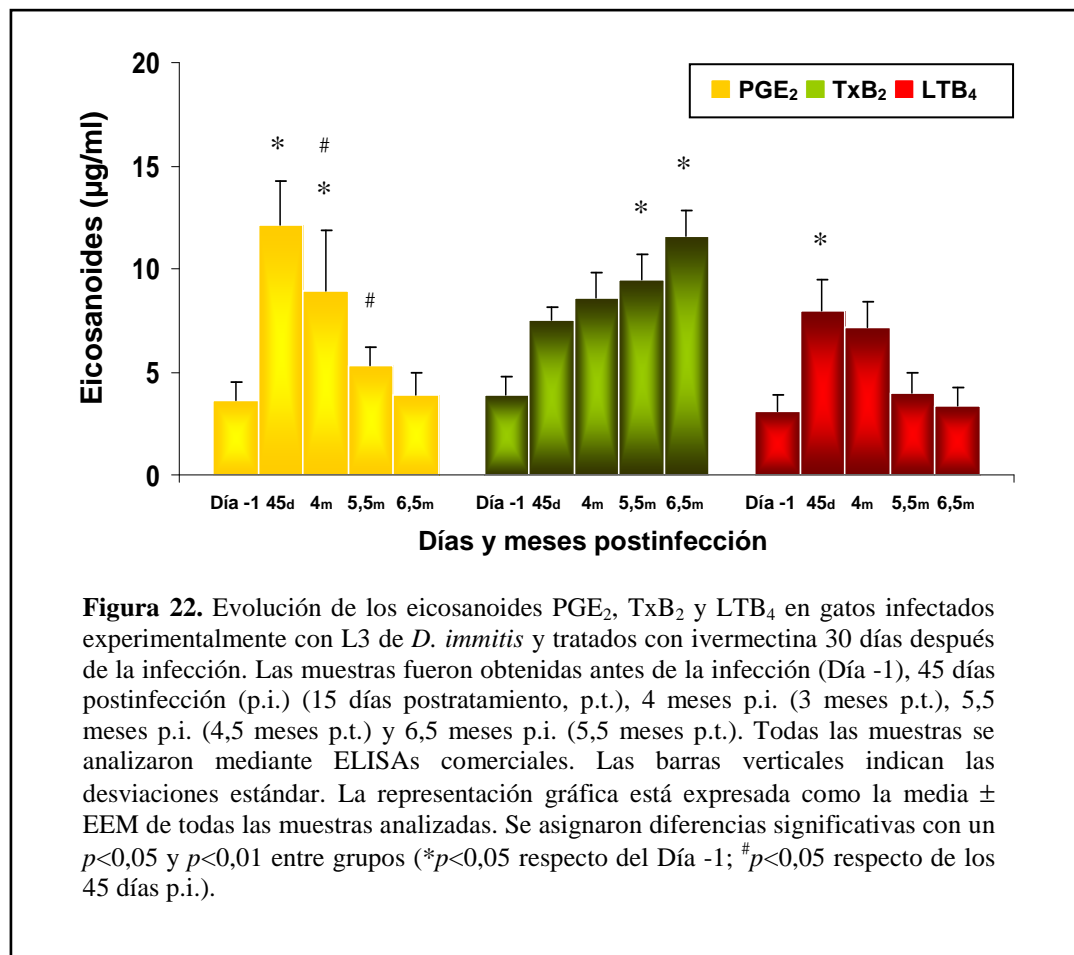
2.2.2. Gatos infectados experimentalmente.

Las variaciones de los niveles de eicosanoides se analizaron en gatos infectados experimentalmente hasta los 6 meses p.i. (Figura 21). La presencia de PGE₂ sufrió un aumento drástico a los 2 meses p.i., alcanzando el valor más elevado de todo el estudio, y descendió según avanzaba la infección hasta el final del estudio. Existen diferencias significativas entre los valores obtenidos previamente a la infección y a los 2 meses p.i. ($p<0,01$), 4 meses p.i. ($p<0,05$) y 6 meses p.i. ($p<0,05$). También se encontraron diferencias significativas entre los valores obtenidos a los 2 y 4 meses p.i. ($p<0,01$) y entre los 2 y 6 meses p.i. ($p<0,01$). No se encontraron diferencias significativas entre los 4 y 6 meses p.i. Los valores de TxB₂ y LTB₄ obtenidos después de la infección aumentaron hasta el final del experimento. En ambos casos fueron significativamente más elevados los valores obtenidos a los 6 meses p.i. que los previos a la infección ($p<0,05$). Además, se observó un aumento moderado entre los meses p.i. intermedios pero sin existir diferencias significativas. A los 6 meses p.i., los valores de cada eicosanoide fueron similares a los obtenidos en gatos infectados naturalmente.



2.2.3. Gatos infectados experimentalmente y tratados con ivermectina.

El efecto de la muerte de las larvas de *D. immitis* sobre la producción de PGE₂, TxB₂ y LTB₄ se analizó en gatos infectados experimentalmente y tratados con ivermectina (Figura 22). El patrón evolutivo de la PGE₂, en los gatos infectados experimentalmente y tratados con ivermectina, fue similar al observado en los gatos infectados sin tratar, si bien los valores fueron inferiores. La PGE₂ alcanza su máximo valor 45 días p.i. (15 días postratamiento, p.t.) y posteriormente desciende hasta el final del estudio. Se encontraron diferencias significativas entre los valores obtenidos antes de la infección y 45 días y 3 meses p.i. (15 y 90 días p.t., respectivamente) ($p < 0,05$), pero no entre 45 días y 3 meses p.i. Además, los niveles de PGE₂ observados en la fase final del estudio (5,5 y 6,5 meses p.i.), fueron significativamente más bajos que los observados 45 días p.i. ($p < 0,05$). No se encontraron diferencias significativas entre los valores observados antes de la infección y al final del estudio.



Los valores de TxB_2 aumentaron progresivamente hasta el final del estudio (6,5 meses p.i., $p<0,05$). Se encontró una clara diferencia entre los patrones evolutivos de LTB_4 en gatos tratados y no tratados. Este eicosanoide aumentó a los 45 días p.i. ($p<0,05$) respecto de los valores previos a la infección, disminuyendo después hasta el final del estudio (6,5 meses p.i.). No se encontraron diferencias significativas entre los valores obtenidos antes de la infección y a los 6,5 meses p.i.

2.3. Eicosanoides en humanos.

La presencia de eicosanoides se estudió en el suero de los individuos humanos incluidos en los 3 grupos seleccionados previamente (Figura 23). La presencia de PGE_2 no se detectó en ninguno de los sueros analizados mientras que la del TxB_2 y del LTB_4 sí lo fue en individuos seropositivos sanos y con nódulo pulmonar. Los valores de TxB_2 en los individuos con nódulo pulmonar fueron significativamente más elevados que los obtenidos en los individuos seropositivos sanos y que en los individuos control ($p<0,01$ en ambos casos). Además, los valores obtenidos en los individuos seropositivos sanos son significativamente más elevados que en los observados en los controles ($p<0,01$). La concentración de LTB_4 fue significativamente más elevada en los individuos seropositivos sanos que en los individuos con nódulo pulmonar y que en los controles ($p<0,05$ en ambos casos). No se encontraron diferencias significativas entre los individuos con nódulo pulmonar y los individuos sanos.

Además se compararon los valores de PGE_2 , TxB_2 y LTB_4 obtenidos en cada uno de los grupos (Figura 24). El TxB_2 es el eicosanoide predominante en los individuos seropositivos sanos y en los individuos con nódulo pulmonar. En los individuos sanos, los valores de los 3 eicosanoides son similares. En individuos seropositivos sanos, la presencia de TxB_2 es significativamente más elevada que la de PGE_2 ($p<0,05$) y moderadamente más alta que la de LTB_4 . Además, existen diferencias significativas entre los valores de PGE_2 y LTB_4 ($p<0,05$). En los individuos con nódulo pulmonar, los valores de TxB_2 son significativamente más elevados que los de PGE_2 y LTB_4 ($p<0,01$ en ambos casos) y no se encontraron diferencias significativas entre PGE_2 y LTB_4 .

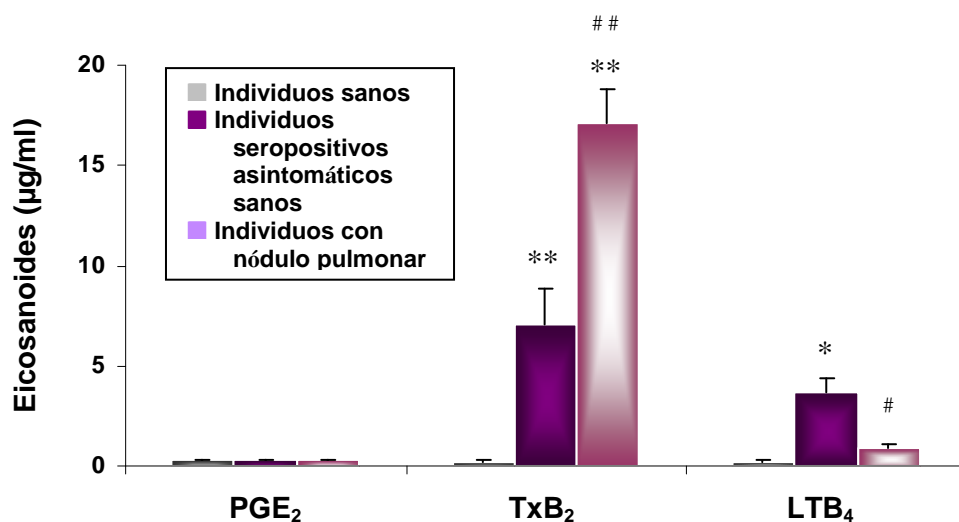


Figura 23. Concentración de PGE₂, TxB₂ y LTB₄ en individuos sanos, y en individuos seropositivos sanos y con nódulo pulmonar infectados con *D. immitis*. Las muestras se analizaron mediante ELISAs comerciales. Los resultados se expresaron como la media \pm EEM de todas las muestras analizadas. Se asignaron diferencias significativas con un $p < 0,05$ y $p < 0,01$ entre grupos (* $p < 0,05$ respecto del grupo de individuos sanos; ** $p < 0,01$ respecto del grupo de individuos sanos; # $p < 0,05$ respecto del grupo de individuos seropositivos sanos; ## $p < 0,01$ respecto del grupo de individuos seropositivos sanos).

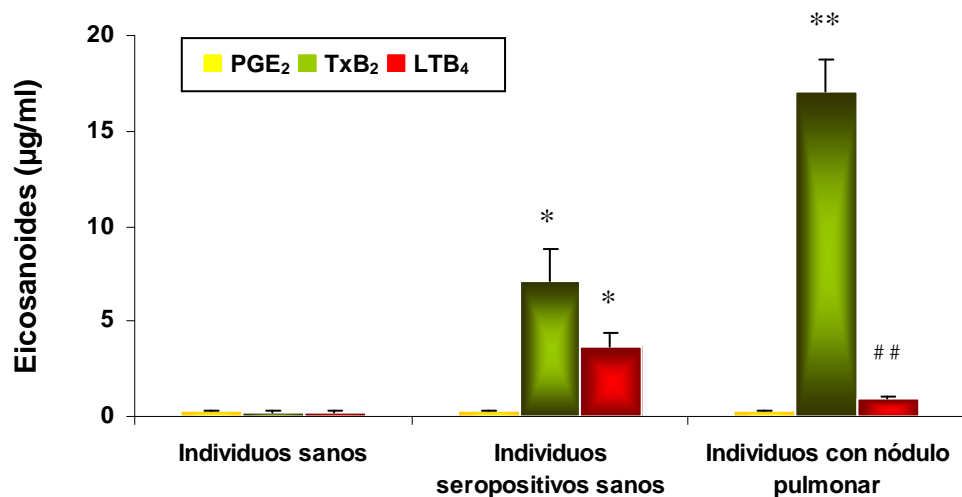
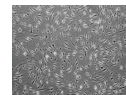


Figura 24. Concentración de PGE₂, TxB₂ y LTB₄ en individuos humanos con nódulo pulmonar, individuos seropositivos infectados por *D. immitis* e individuos sanos. Todas las muestras se analizaron mediante ELISAs comerciales. Los resultados se expresan como la media \pm EEM de todas las muestras analizadas. Se asignaron diferencias significativas con un $p < 0,05$ y $p < 0,01$ entre grupos (* $p < 0,05$ respecto de la concentración de PGE₂; ** $p < 0,01$ respecto de la concentración de PGE₂; ## $p < 0,01$ respecto de la concentración de TxB₂).



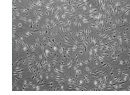
3. Diseño de un modelo experimental *in vitro* con células endoteliales vasculares.

El primer paso para la realización de esta parte de la tesis fue la búsqueda y puesta a punto de un modelo experimental basado en el empleo de células endoteliales vasculares. Se eligió una línea de células endoteliales vasculares humanas denominada HAAE-1, y se estudió su comportamiento para identificar las condiciones óptimas de trabajo. Por este motivo se procedió a valorar una serie de parámetros indispensables para conseguir la reproducibilidad de los experimentos. Dichos parámetros fueron:

1. El tiempo necesario para que las células endoteliales conformen una monocapa confluyente sobre un soporte sólido (placa petri).
2. La posibilidad de hacer pases con las células de unas placas a otras y así, poder ampliar el cultivo celular al máximo, sin que se viesen alteradas sus propiedades fisiológicas.
3. El máximo número de pases de las células, buscando el mayor rendimiento del cultivo, y trabajar siempre en las mismas condiciones.
4. El número de células que se deben sembrar, según el pase y el tiempo de espera elegidos, para que dichas células confluyan en una monocapa, dependiendo del tamaño del soporte y del ensayo a realizar.

Con las condiciones de trabajo indicadas por la casa comercial (ATCC-LGC Promochem), el crecimiento de la monocapa de células endoteliales fue el esperado. Las células conformaron una monocapa confluyente en aproximadamente 7 días. También se observó que las células morían y se levantaban de la placa si permanecían más de un día en confluencia. Esto se debe a que este tipo de las células endoteliales presentan inhibición por contacto.

Esta línea celular es susceptible de expandirse mediante sucesivos pases de unas placas a otras. En este proceso observamos que, entre el primer y el sexto pase, las células tardaban alrededor de 7 días en estar en confluencia y, a partir del séptimo pase, la monocapa de células disminuía su crecimiento y las células tardaban más de 7 días en confluir. Entre el octavo y el décimo pase, las células tardaban más de 10 días en estar en confluencia. Por ello, se eligió como idóneo el pase 6 para realizar todos los estudios.

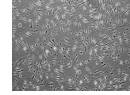


Por último, se analizó el número de células endoteliales que había que sembrar en diferentes soportes de plástico y el número de días que había que esperar, en función del porcentaje de confluencia de tuvieran las células endoteliales. En placas de 24 pocillos (15 mm de diámetro por pocillo) se sembraron 10.000, 30.000, 50.000 y 70.000 células por pocillo, en placas de 60 mm de diámetro 100.000, 300.000, 500.000 y 700.000 células por pocillo y en placas de 100 mm de diámetro 1.000.000, 3.000.000, 5.000.000 y 7.000.000 de células por pocillo.

En placas de 24 pocillos (Tabla 10), el porcentaje de confluencia con 10.000 células sembradas por pocillo fue del 10% en los 2 primeros días y menor a partir del tercero. Con 30.000 células por pocillo, la confluencia en los 2 primeros días se mantuvo en el 20% y aumentó progresivamente, alcanzando el 80% al séptimo día. Con 50.000 células por pocillo, la confluencia fue del 40% el primer día, alcanzando el 100% el quinto. Finalmente, con 70.000 células por pocillo, la confluencia observada el primer día fue del 90% y el segundo llegó al 100%. Estos resultados nos indican que cuanto mayor es el número de células que se sembraban en cada pocillo, menor es el tiempo que tardan las células en confluir. Observamos también que cuando el porcentaje de confluencia es menor del 10%, las células están aisladas o se agregan en pequeños grupos durante 2 ó 3 días y, finalmente se separan de la superficie de los pocillos y mueren.

Placa de 24 pocillos							
Nº de células	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
10.000	10%	10%	-	-	-	-	-
30.000	20%	20%	30%	50%	60%	70%	80%
50.000	40%	60%	80%	90%	100%		
70.000	90%	100%					

Tabla 10. Porcentaje de confluencia en placas de 24 pocillos según el número de células sembradas a lo largo de 7 días.

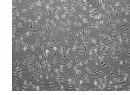


En placas petri de 60 mm de diámetro (Tabla 11), con 100.000 células sembradas, la confluencia que se observó el primer día fue del 10% y alcanzó el 100% el noveno día. Con 300.000 células, la confluencia fue del 30% el primer día y del 100% el séptimo día. Con 500.000 células, la confluencia fue del 40% el primer día, del 90% el cuarto y del 100% el quinto. Con 700.000 células sembradas, la confluencia alcanzó el 100% al segundo día. Estos datos confirman las observaciones anteriores que muestran que cuantas más células se siembran menor tiempo necesario para obtener un cultivo confluyente. Los porcentajes de confluencia que se obtuvieron con 500.000 células en placas de 60 mm se repetían con 50.000 células en placas de 24 pocillos a lo largo de 5 días.

Placas petri de 60 mm							
Nº de células	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
100.000	10%	20%	40%	50%	60%	70%	80%
300.000	30%	40%	60%	60%	70%	90%	100%
500.000	40%	60%	80%	90%	100%		
700.000	90%	100%					

Tabla 11. Porcentaje de confluencia en placas petri de 60 mm de diámetro según el número de células sembradas a lo largo de 7 días.

Por último, en las placas petri de 100 mm (Tabla 12), con 1.000.000 de células sembradas, la confluencia fue del 40% el primer día y llegó al 100% el quinto día. Con 3.000.000 de células, la confluencia fue del 50% el primer día y alcanzó el 100% el cuarto día. Con 5.000.000 y 7.000.000 de células se obtuvo el 100% de confluencia al tercer y segundo día respectivamente. En ambos casos, los porcentajes de confluencia observados el primer día fueron los más elevados de todos los estudiados. Igual que en los casos anteriores, cuanto mayor fue el número de células sembradas, menor fue el tiempo de espera para que los cultivos estuvieran en confluencia. Los porcentajes de

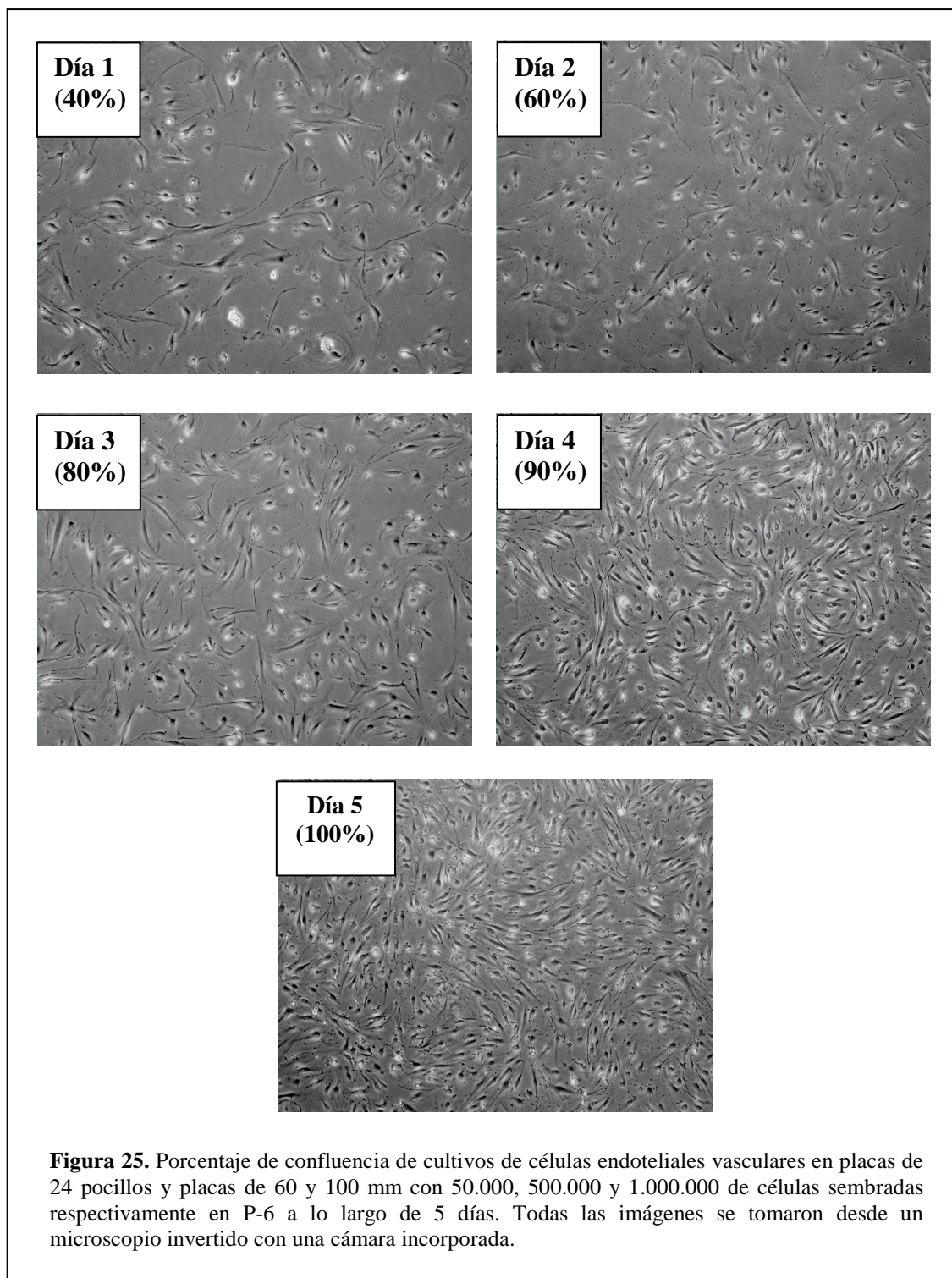
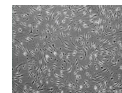


confluencia que se obtuvieron con 1.000.000 de células en placas de 100 mm se repetían con 500.000 células en placas de 60 mm y 50.000 células en placas de 24 pocillos a lo largo de 5 días.

Placas petri de 100 mm							
Nº de células	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
1.000.000	40%	60%	80%	90%	100%		
3.000.000	50%	80%	90%	100%			
5.000.000	80%	90%	100%				
7.000.000	90%	100%					

Tabla 12. Porcentaje de confluencia en placas petri de 100 mm de diámetro según el número de células sembradas a lo largo de 7 días.

Con estos datos se optó por sembrar 50.000, 500.000 y 1.000.000 de células endoteliales en las placas de 24 pocillos, en las placas petri de 60 mm y 100 mm de diámetro, respectivamente, esperando 4 días para que los cultivos estuvieran al 90% de confluencia. En la Figura 25, se muestran imágenes representativas de los porcentajes de confluencia con 50.000, 500.000 y 1.000.000 de células endoteliales sembradas en los 3 tipos de soporte a lo largo de 5 días.





4. Presencia de la bacteria endosimbionte *Wolbachia* en los vermes adultos de *D. immitis*.

Puesto que actualmente se considera a la bacteria endosimbionte *Wolbachia* una de las responsables de las reacciones inflamatorias producidas por *D. immitis*, antes de analizar las condiciones en las que se deberían tratar los cultivos de células endoteliales vasculares con el extracto antigénico de *D. immitis*, comprobamos la presencia de *Wolbachia* en los vermes empleados para elaborar dicho antígeno. Se empleó la técnica de inmunohistoquímica, basada en un anticuerpo policlonal anti-WSP generado en conejo.

Wolbachia se detectó tanto en los vermes adultos machos de *D. immitis* como en las hembras. En los machos (Figura 26) se identificó exclusivamente en los cordones hipodérmicos y, en las hembras (Figura 27) en los cordones hipodérmicos y dentro de los ovocitos contenidos en el útero.

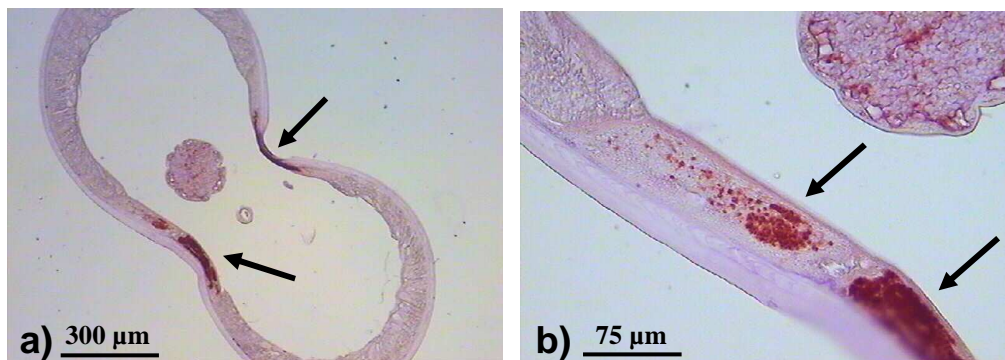
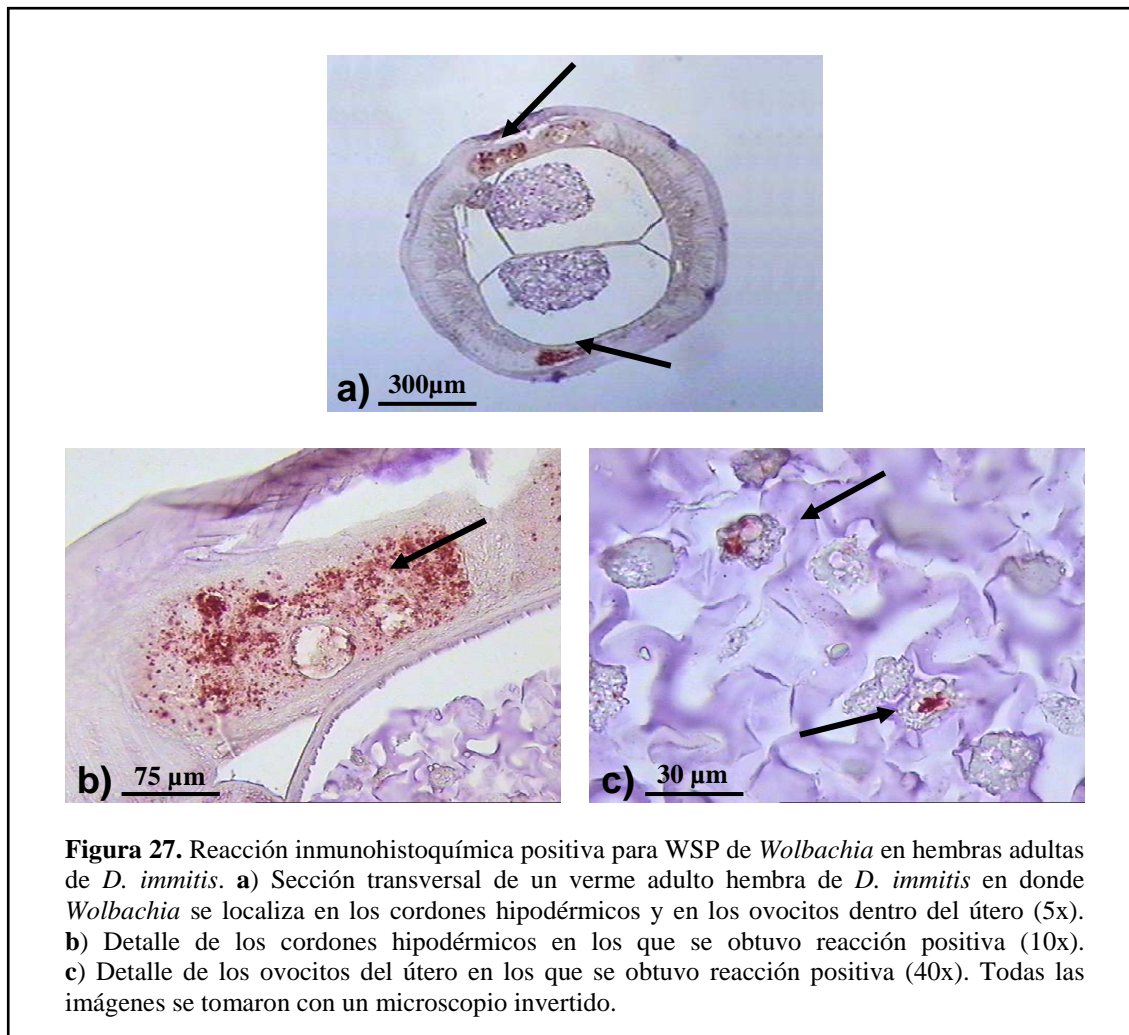


Figura 26. Reacción inmunohistoquímica positiva para WSP de *Wolbachia* en machos adultos de *D. immitis*. **a)** Sección transversal de un verme adulto macho de *D. immitis* en la que *Wolbachia* se localiza en los cordones hipodérmicos (5x). **b)** Detalle de los cordones hipodérmicos en los que se obtuvo reacción positiva (10x). Todas las imágenes se tomaron con un microscopio invertido.



5. Condiciones de tratamiento de las células endoteliales vasculares con el extracto antigénico de *D. immitis* (DiSA).

5.1. Puesta a punto del tratamiento.

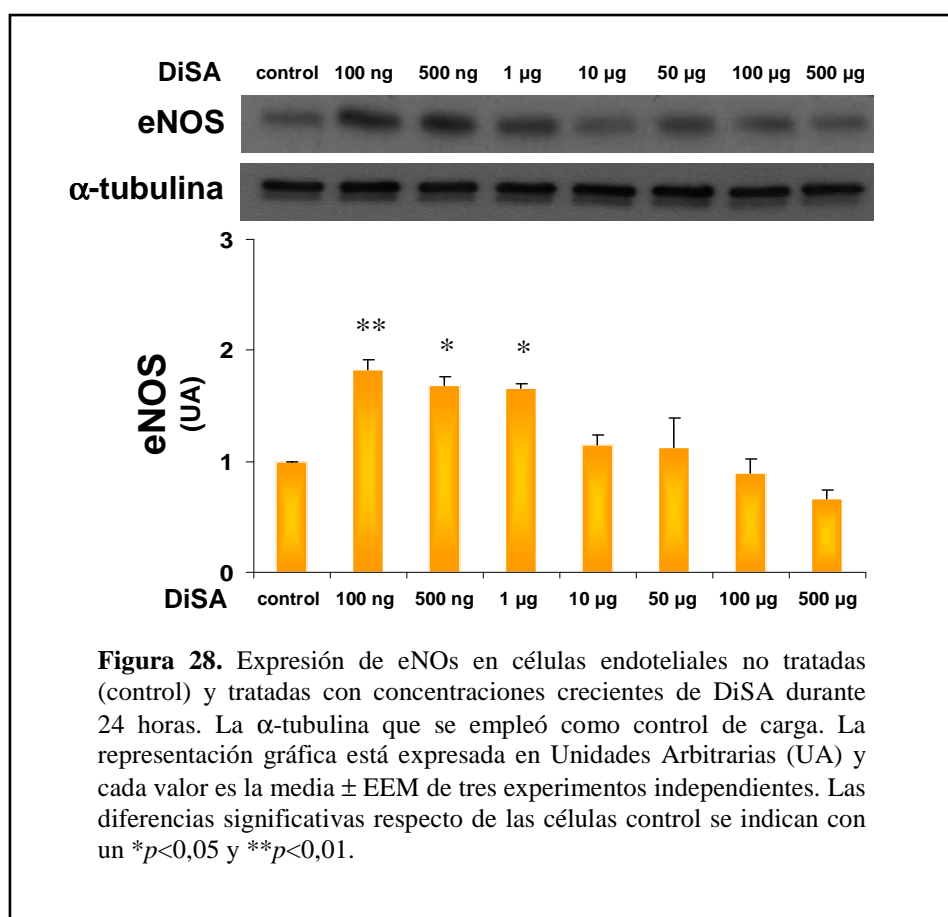
Una vez optimizadas las condiciones del cultivo estudiamos la concentración óptima de antígeno de *D. immitis* para el tratamiento de las células endoteliales.

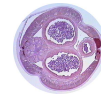
Analizamos el efecto de diferentes concentraciones de DiSA sobre la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), la ciclooxigenasa-1 (COX-1) y la ciclooxigenasa-2 (COX-2), enzimas que se expresan constitutivamente por las células endoteliales y



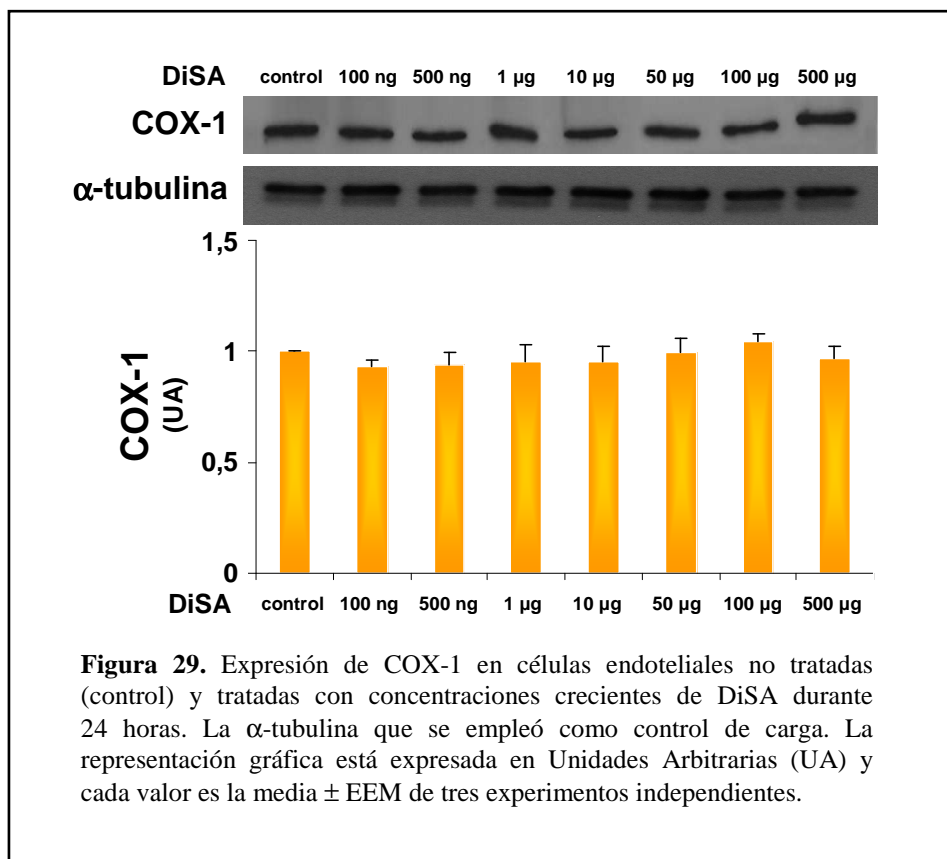
varían su expresión en función de un estímulo. Analizamos su expresión, mediante Western Blot, con anticuerpos específicos a partir de extractos de proteínas procedentes de cultivos confluentes de células endoteliales tratados y no tratados con concentraciones crecientes de DiSA (100 ng/ml, 500 ng/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml y 500 µg/ml) durante 24 horas. Los cultivos de células endoteliales sin tratar se emplearon como control negativo. Como control de carga se empleó la proteína α-tubulina.

Observamos un aumento significativo de la expresión de eNOS en células endoteliales tratadas con 100 ng/ml de DiSA en comparación con los cultivos sin tratar ($p<0,01$) (Figura 28). Los valores de expresión obtenidos con 500 ng/ml y 1 µg/ml de DiSA resultaron, también, significativamente superiores respecto del control ($p<0,05$ en ambos casos) aunque con valores moderadamente inferiores a los obtenidos con 100 ng/ml de DiSA. El resto de las concentraciones de DiSA no modificaron significativamente la expresión de eNOS aunque sí se obtuvieron valores moderadamente más bajos que en los cultivos control.





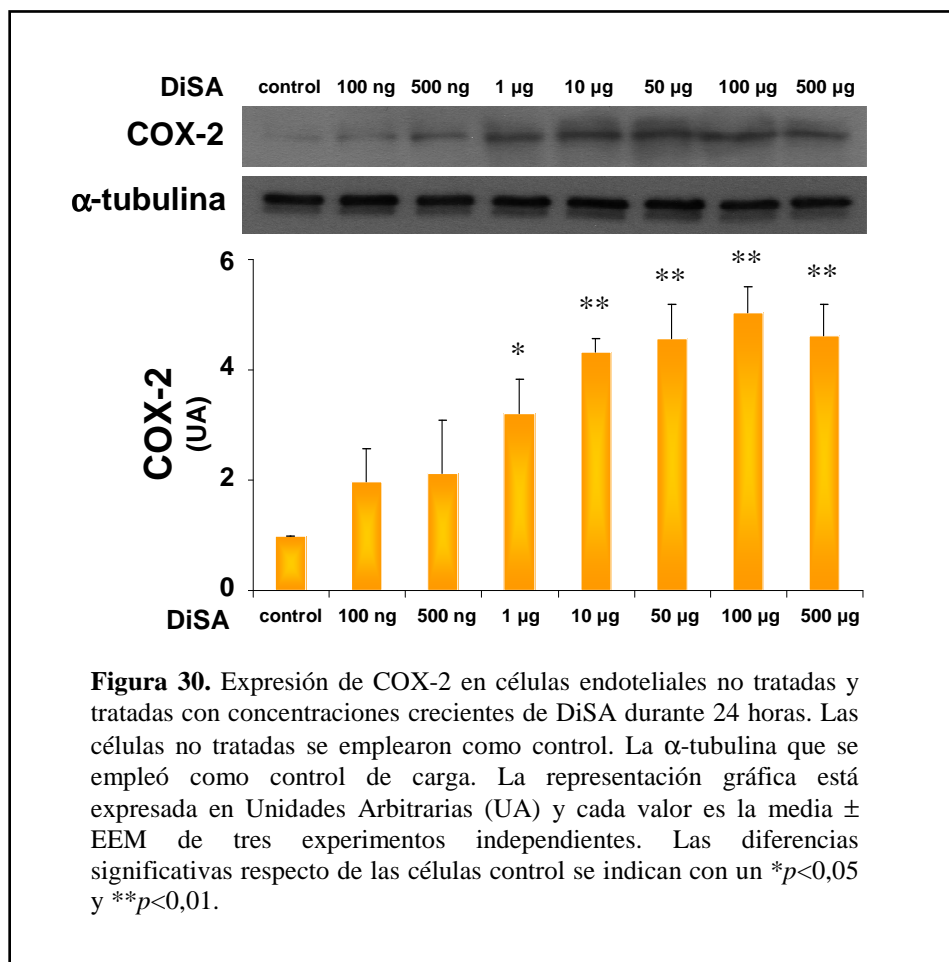
Por lo que se refiere a la COX-1, no encontramos diferencias significativas en la expresión que presentan los cultivos tratados y no tratados con las diferentes concentraciones de DiSA (Figura 29).



Cuando analizamos los resultados de COX-2 (Figura 30), observamos que su expresión depende de la concentración de DiSA. A medida que aumentaba la concentración del antígeno, se incrementaba la expresión de COX-2. Los tratamientos con 100 ng/ml y 500 ng/ml de DiSA produjeron un aumento moderado no significativo de su expresión en comparación con las células control. Sin embargo, el tratamiento con 1 μ g/ml de DiSA determinó un aumento significativo de la expresión de COX-2 ($p < 0,05$) y los tratamientos entre 10 y 500 μ g/ml de DiSA aumentaron



significativamente aún más su expresión ($p<0,01$ en todos los casos) en comparación con las células control.



Tanto los cultivos tratados, como los no tratados, se vigilaron continuamente con un microscopio invertido para determinar la aparición de cambios no esperados (Figura 31). Como muestran las imágenes, no aparecieron cambios en la disposición, morfología y crecimiento de las células, ni en los cultivos sometidos a tratamiento con DiSA ni en los no tratados.

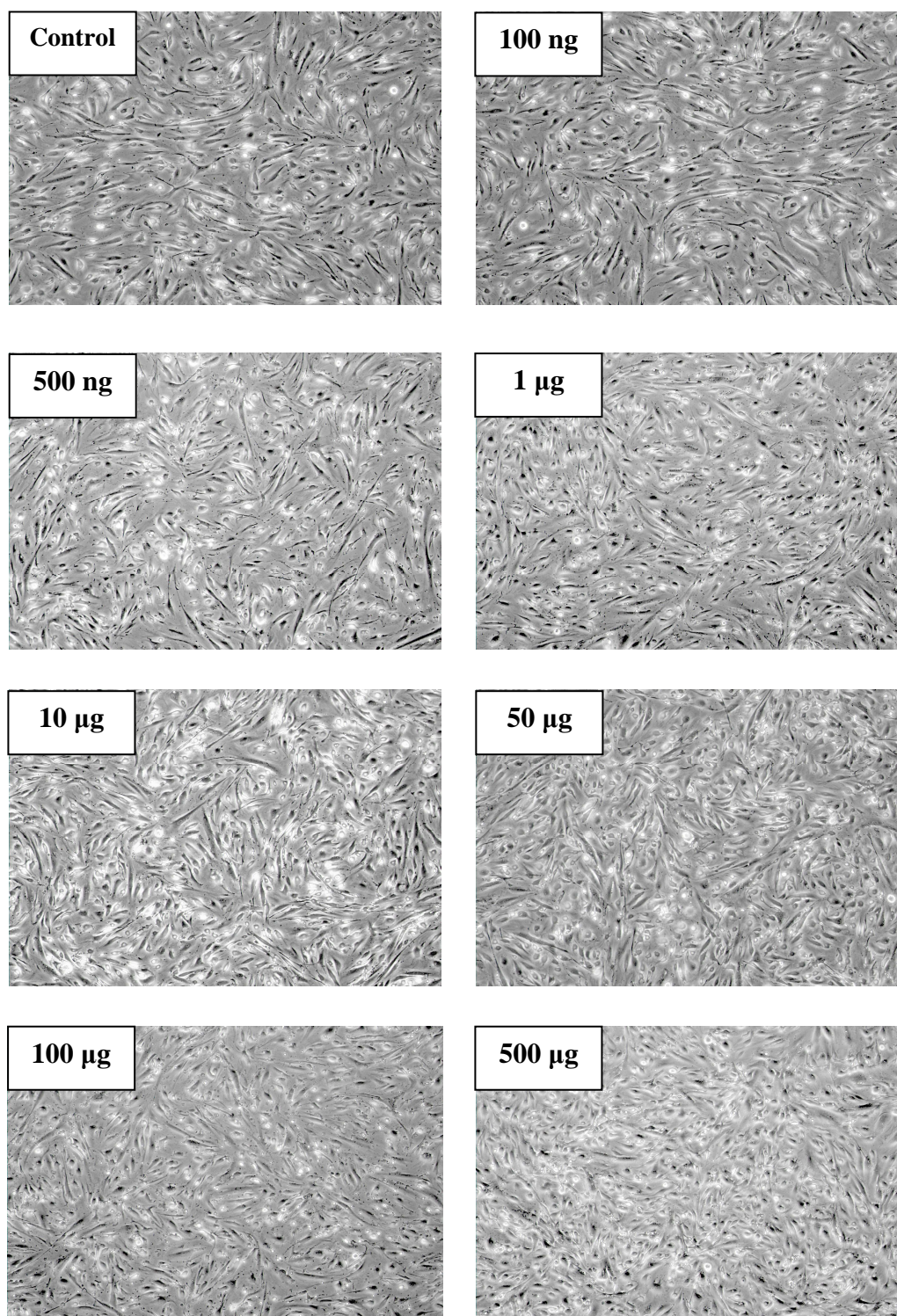
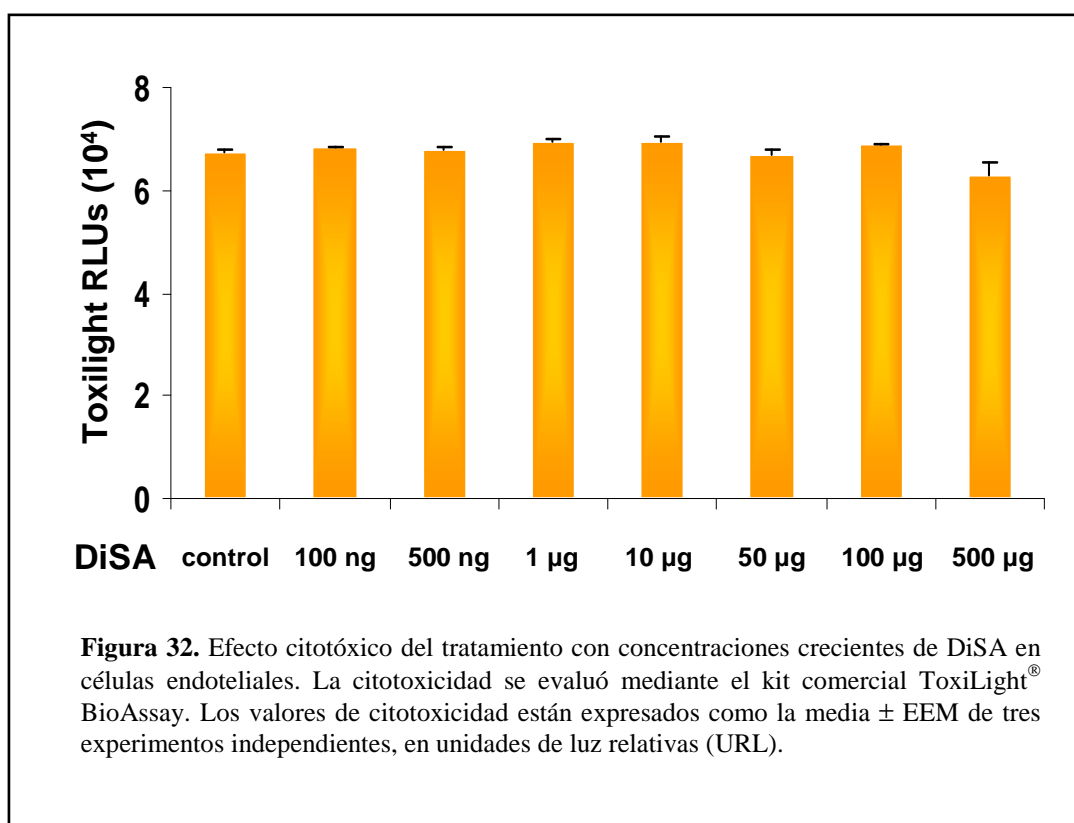


Figura 31. Imágenes representativas de, al menos, tres experimentos independientes, de los cultivos de células endoteliales tratados con concentraciones crecientes de DiSA y no tratados (control). Las células se observaron mediante un microscopio invertido y todas las imágenes se tomaron a 20x.



5.2. Estudio del posible efecto citotóxico de DiSA sobre las células endoteliales vasculares.

Analizamos, además, el posible efecto citotóxico de DiSA sobre las células endoteliales. Se empleó el kit comercial ToxiLight® *BioAssay* en los sobrenadantes de los cultivos celulares tratados y sin tratar. El tratamiento con cualquier concentración de DiSA no produjo efecto citotóxico alguno sobre las células endoteliales. Los valores obtenidos en las células control fueron similares al del resto de las células tratadas con la excepción del tratamiento con 500 µg de DiSA con el que se observó un ligero descenso citotóxico pero, en ningún caso, se obtuvieron diferencias significativas (Figura 32).





Con todos estos resultados se decidió que la concentración óptima para efectuar el tratamiento con DiSA en células endoteliales era la de 1 $\mu\text{g/ml}$. Esta dosis es la única en la que coinciden dos hechos:

- 1) No hay efecto tóxico sobre las células.
- 2) Produce diferencias estadísticamente significativas en la expresión de eNOS y COX-2 respecto de las células control.

6. Condiciones de tratamiento de las células endoteliales vasculares con WSPr.

6.1. Puesta a punto del tratamiento.

Al igual que con DiSA, estudiamos la concentración óptima de WSPr para el tratamiento de células endoteliales analizando, el nivel de expresión de eNOS, COX-1 y COX-2 mediante Western Blot en extractos de proteínas de cultivos confluentes tratados con concentraciones crecientes de WSPr durante 24 horas y sin tratar. Las células endoteliales no tratadas y la proteína α -tubulina se emplearon como control negativo y control de carga, respectivamente. Las concentraciones elegidas para el análisis fueron 100 ng/ml, 500 ng/ml y 1 $\mu\text{g/ml}$ de WSPr.

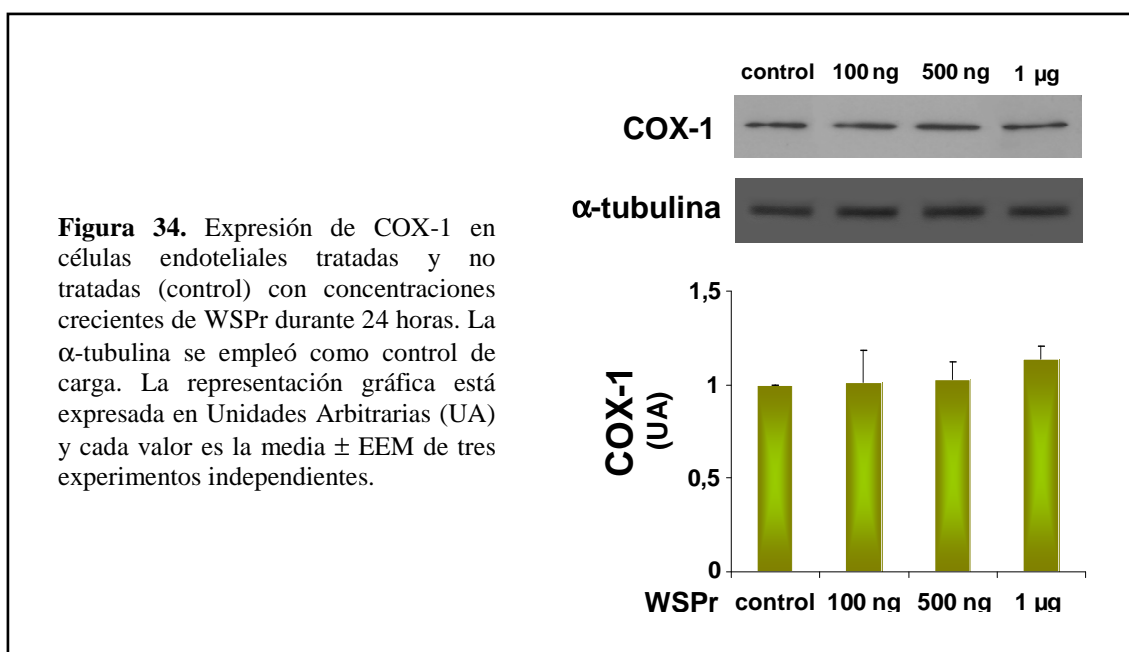
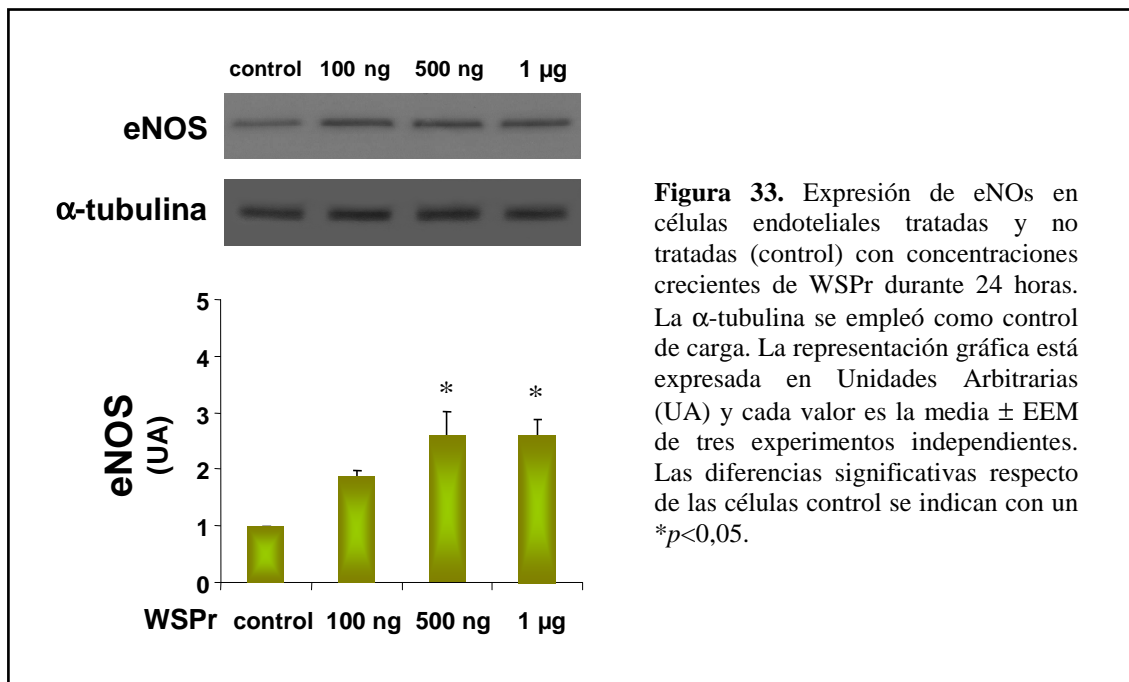
La expresión de eNOS aumento progresivamente según se incrementó la concentración de WSPr (Figura 33). En células tratadas con 100 ng/ml de WSPr, la expresión de eNOS aumentó de forma moderada pero no significativa en comparación con las células no tratadas. Sin embargo, con concentraciones de 500 ng/ml y de 1 $\mu\text{g/ml}$ de WSPr se obtuvieron niveles de expresión significativamente superiores ($p < 0,05$ en ambos casos).

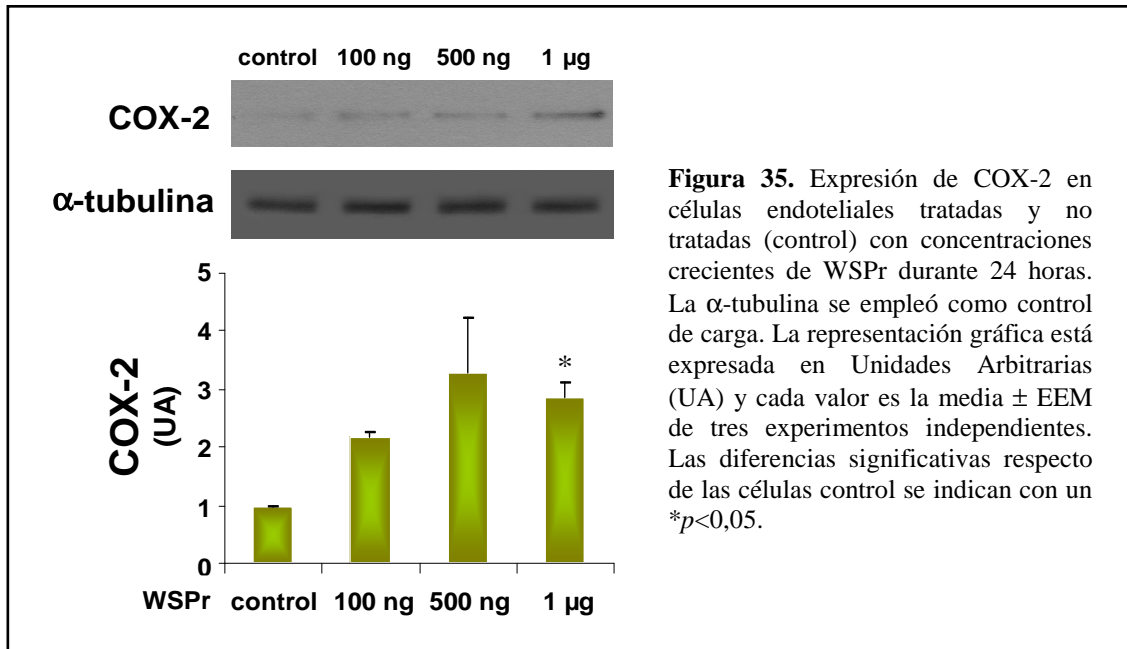
No se observaron variaciones significativas en la expresión de COX-1 entre los cultivos tratados con las 3 concentraciones de WSPr antes señaladas y los cultivos control sin tratar (Figura 34).

La expresión de COX-2 aumentó progresivamente en comparación con las células control sin tratar cuando el tratamiento se realizó con 100 y 500 ng/ml de WSPr, aunque no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los dos casos. Con



1 $\mu\text{g/ml}$ de WSPr sí se observó un aumento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) (Figura 35).



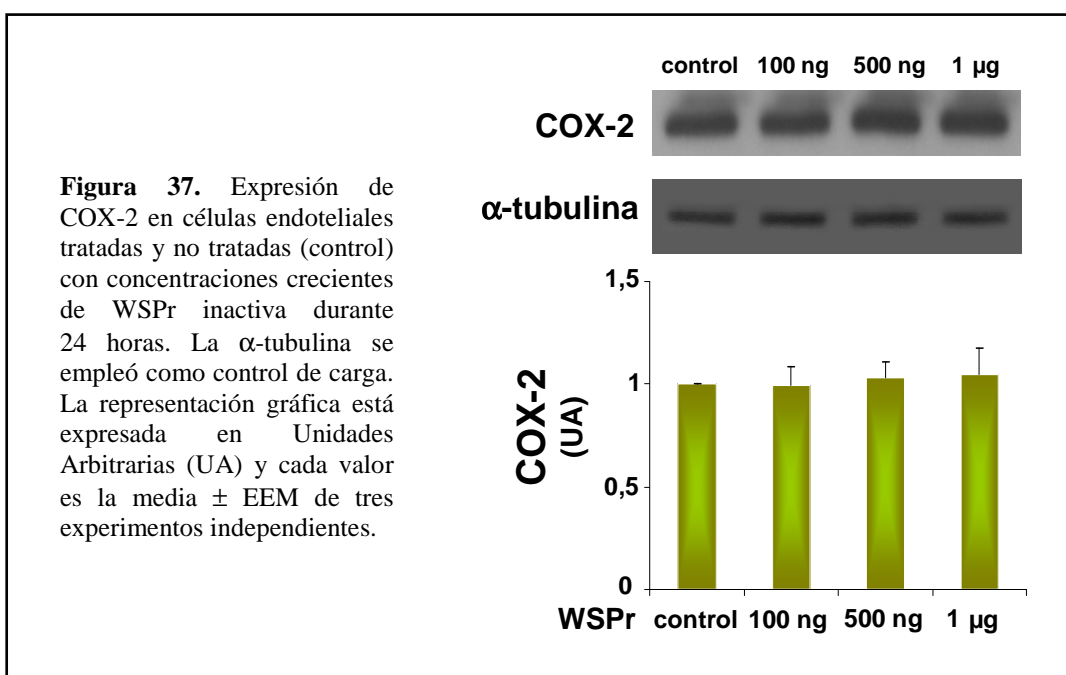
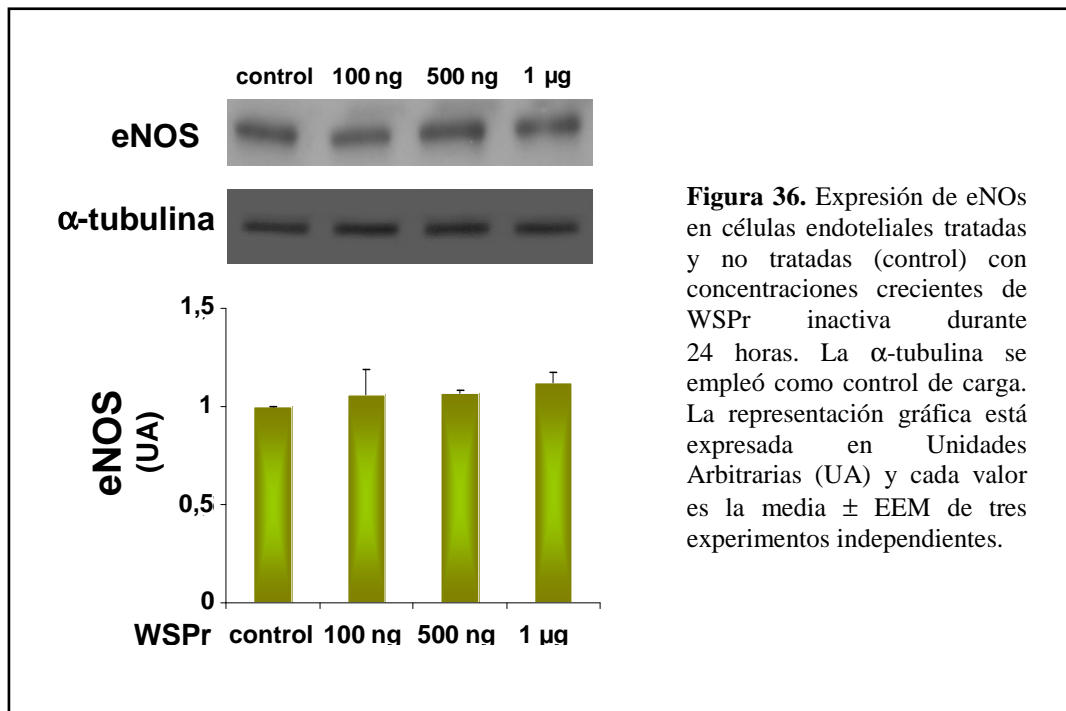


Para demostrar, además, que los cambios que se producen en la expresión de eNOS y COX-2 estaban provocados por la WSPr y no por una posible contaminación de LPS proveniente de la cepa M15pRep4 de *Escherichia coli* en donde se expresó, la WSPr se dializó varias veces con una membrana de intercambio aniónico, se analizó con el Test *Limulus Amebocyte Lysate* y se calentó hasta 95°C. La proteína WSPr se inactiva con esta temperatura mientras que el LPS lo hace a partir de los 200°C. Una vez realizado el tratamiento térmico, las células endoteliales se trataron de nuevo y se analizó solamente el nivel de expresión de eNOs (Figura 36) y COX-2 (Figura 37) al no haber obtenido diferencias entre las células control y las células tratadas con WSPr en el caso de COX-1. En ninguno de los casos se obtuvieron diferencias significativas en la expresión de ambas enzimas entre las células control y con cualquiera de las 3 dosis de WSPr empleadas sobre las células endoteliales descartando así el efecto de una posible contaminación con LPS.

Además, las células endoteliales se monitorizaron mediante un microscopio invertido para ver posibles cambios morfológicos o de disposición, etc. entre las células



control y células tratadas con WSPr, no observándose ningún cambio aparente (Figura 38).



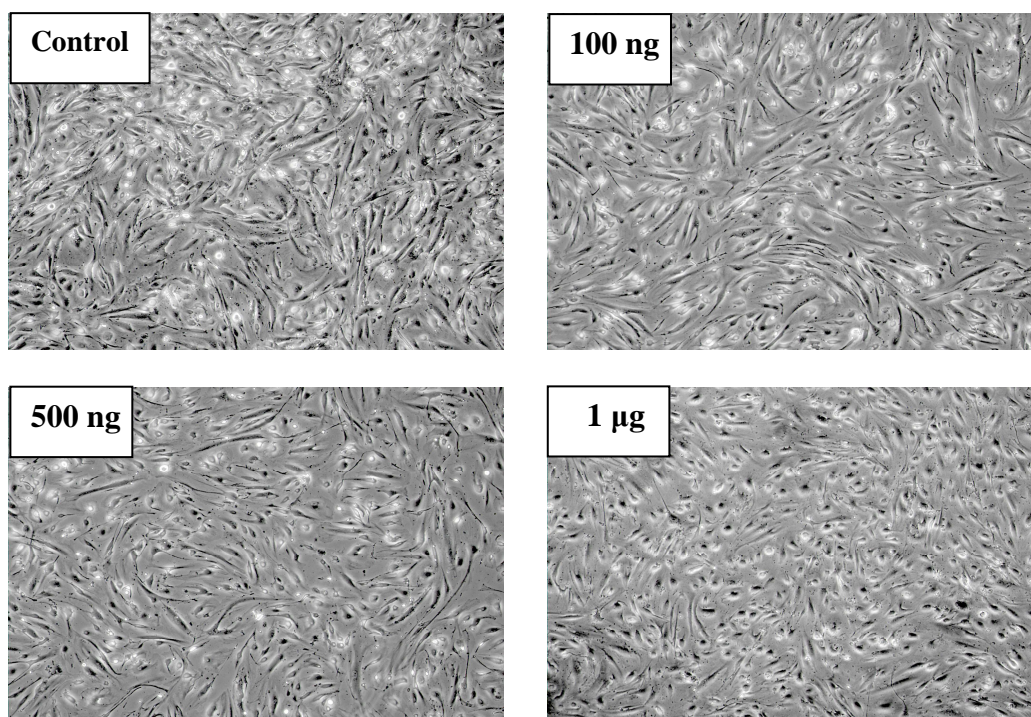
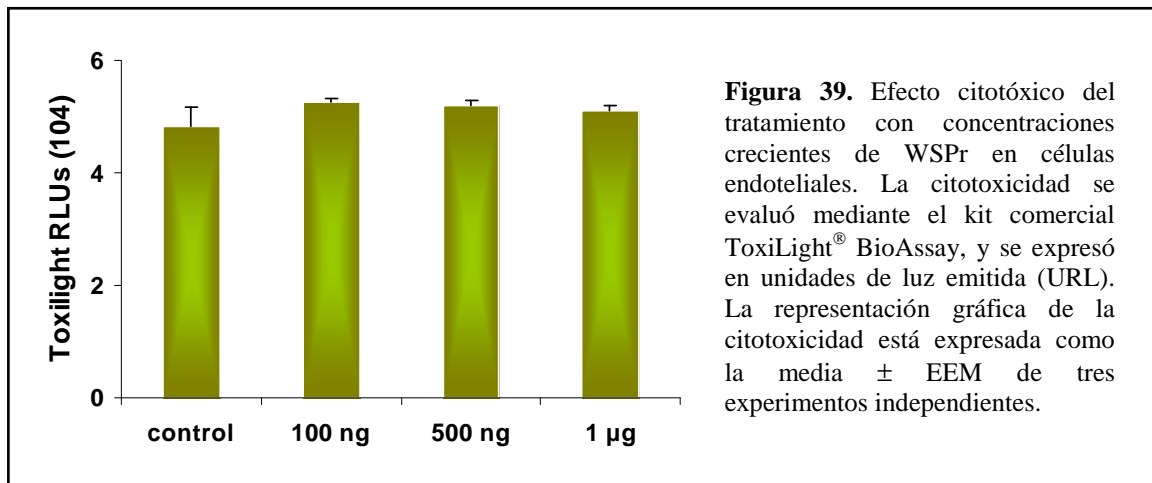
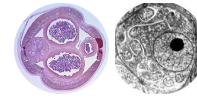


Figura 38. Imágenes representativas de, al menos, tres experimentos independientes, de los cultivos de células endoteliales tratados con concentraciones crecientes de WSPr y no tratados (control). Las células se observaron mediante un microscopio invertido y todas las imágenes se tomaron a 20x.

6.2. Estudio del posible efecto citotóxico de WSPr sobre las células endoteliales vasculares.

Por último, se midió el posible efecto citotóxico del tratamiento con WSPr sobre medios de cultivo procedentes de los cultivos de células endoteliales tratadas y no tratadas con las concentraciones crecientes de WSPr con el kit comercial ToxiLight[®] BioAssay, como se muestra en la Figura 39. Los niveles citotóxicos fueron similares tanto en las células control como en las tratadas con concentraciones de WSPr, no encontrándose diferencias significativas entre ellos.

Por tanto, al existir un aumento significativo del nivel de expresión de eNOS y COX-2 solamente con el tratamiento 1 µg/ml de WSPr y no ejercer efecto citotóxico alguno sobre las células endoteliales se eligió dicha concentración para tratar los cultivos de células endoteliales confluentes y realizar los estudios pertinentes.

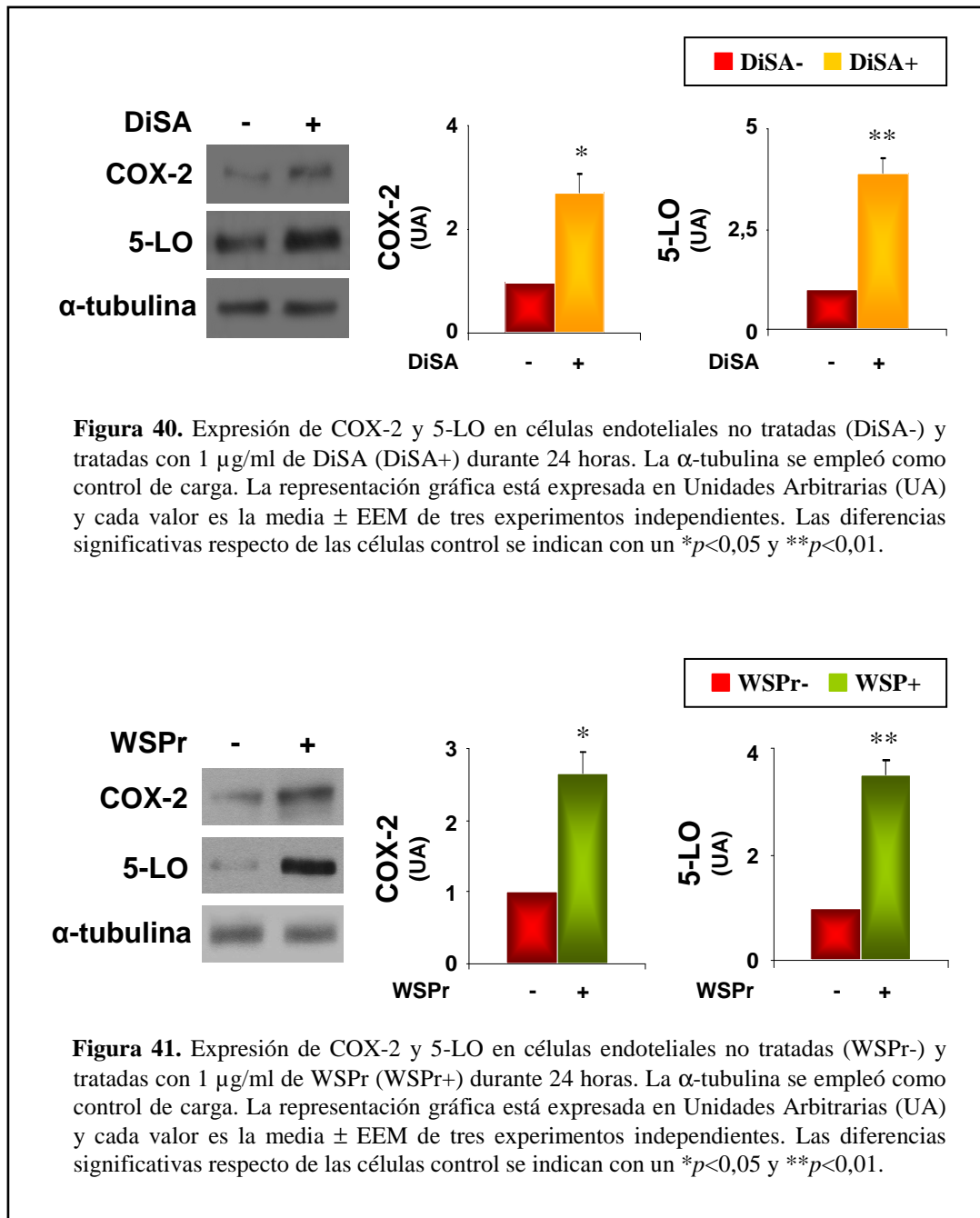
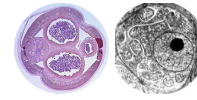


7. Efecto de los antígenos de *Dirofilaria immitis* y *Wolbachia* sobre las células endoteliales vasculares.

7.1. Efecto de DiSA y WSPr sobre algunas moléculas relacionadas con el metabolismo del ácido araquidónico.

El efecto de DiSA y WSPr sobre el metabolismo del ácido araquidónico (AA) en células endoteliales se estudió analizando los cambios en la expresión de dos enzimas, la ciclooxygenasa-2 (COX-2) y la 5-lipooxygenasa (5-LO), y en la síntesis de algunos de sus productos metabólicos. Mediante Western Blot analizamos la expresión de dichas enzimas a partir de extractos de proteínas procedentes de cultivos confluentes tratados con 1 µg/ml de DiSA o WSPr durante 24 horas empleando como controles células sin tratar.

Tanto DiSA (Figura 40) como WSPr (Figura 41) indujeron un incremento significativo de la expresión, tanto de COX-2 ($p < 0,05$) como de 5-LO ($p < 0,01$), en las células tratadas en comparación con la expresión observada en las células sin tratar.



Evaluamos la distribución celular de COX-2 en dichos cultivos mediante la técnica de inmunofluorescencia con el fluorocromo verde Alexa 488. No se estudió la distribución de la 5-LO al no existir en el mercado un anticuerpo específico para esta técnica. COX-2 se localizaba mayoritariamente en la zona perinuclear de las células y en menor medida por todo el citoplasma tanto en las células no tratadas como en las tratadas con DiSA o WSPr (Figura 42).

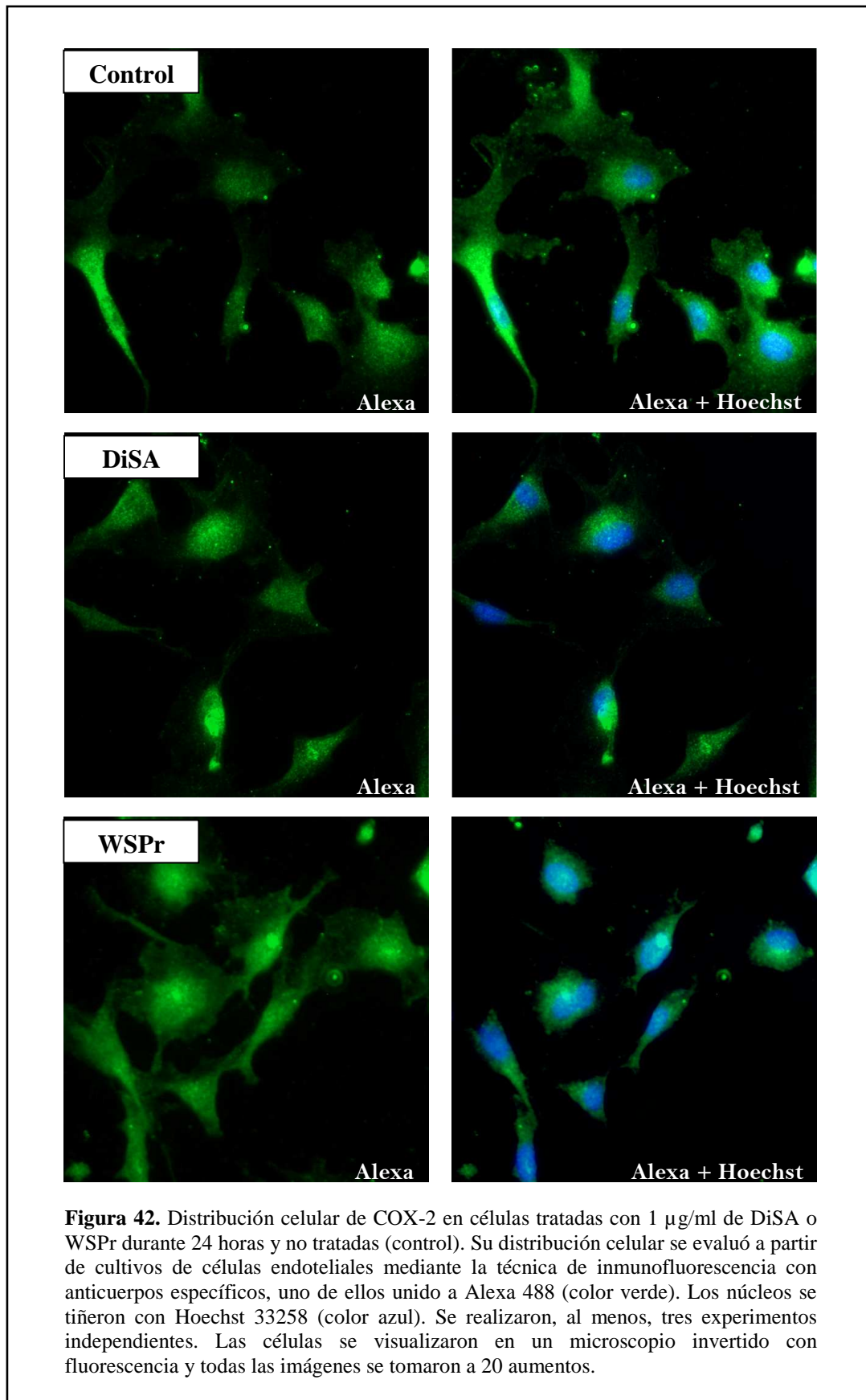
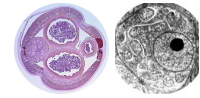
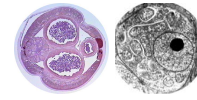
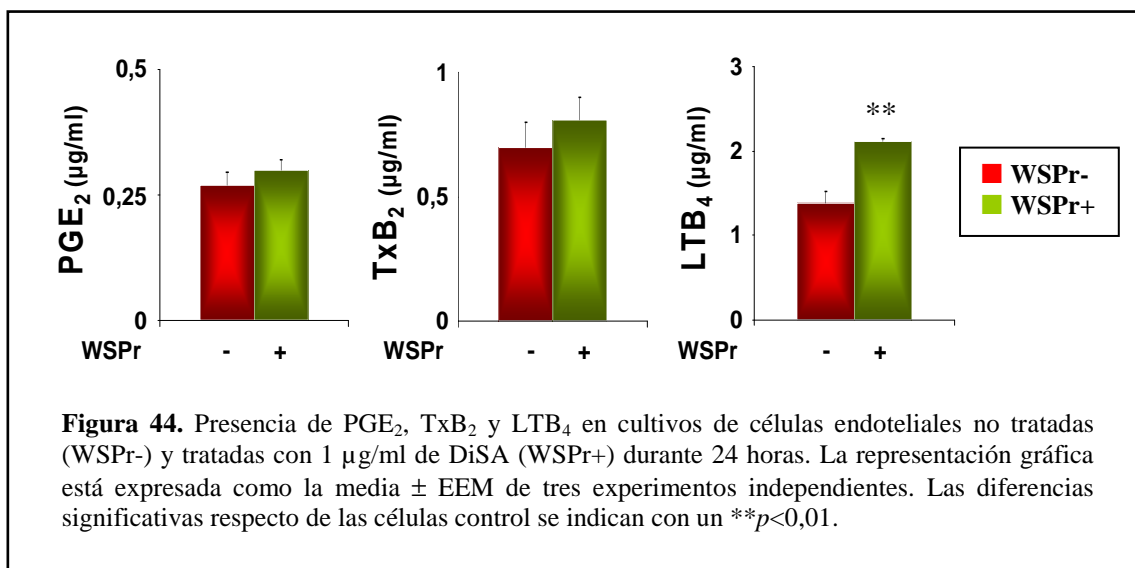
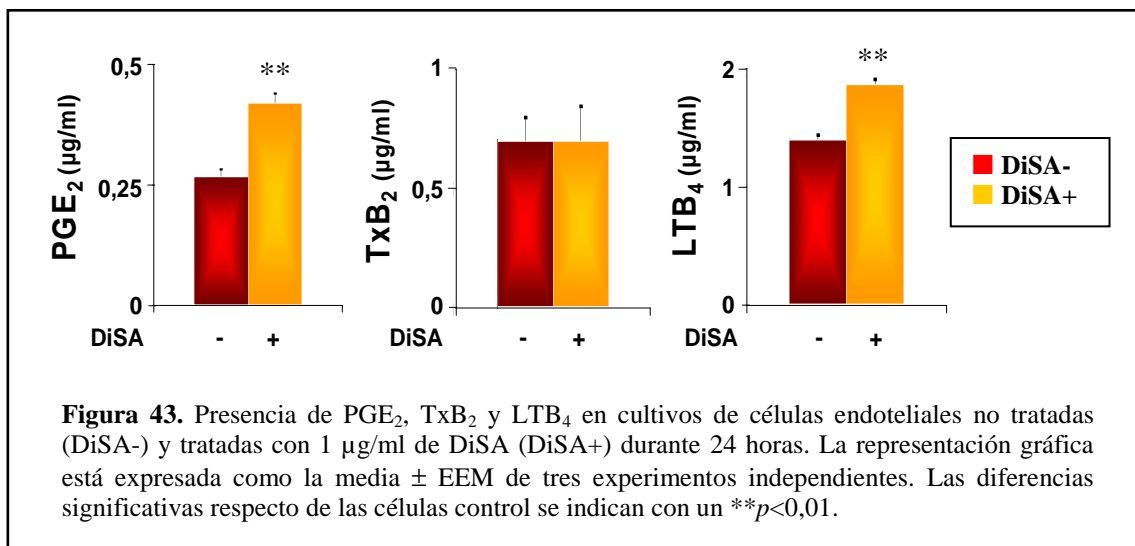
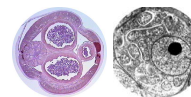


Figura 42. Distribución celular de COX-2 en células tratadas con 1 $\mu\text{g/ml}$ de DiSA o WSPr durante 24 horas y no tratadas (control). Su distribución celular se evaluó a partir de cultivos de células endoteliales mediante la técnica de inmunofluorescencia con anticuerpos específicos, uno de ellos unido a Alexa 488 (color verde). Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33258 (color azul). Se realizaron, al menos, tres experimentos independientes. Las células se visualizaron en un microscopio invertido con fluorescencia y todas las imágenes se tomaron a 20 aumentos.



Para determinar si existen también cambios en la síntesis de eicosanoides derivados de las rutas COX-2 y 5-LO del metabolismo del AA, se analizó la presencia de PGE₂ y TxB₂ (vía de la COX-2) y de LTB₄ (vía de la 5-LO) en los sobrenadantes de cultivos de las células endoteliales no tratadas y tratadas con 1 µg/ml de DiSA o WSPr durante 24 horas mediante ELISAs comerciales. Observamos un aumento significativo en la producción de PGE₂ y LTB₄ en las células tratadas con DiSA respecto a las células control ($p<0,01$), mientras que la producción de TxB₂ no sufrió modificaciones (Figura 43). En los cultivos tratados con WSPr (Figura 44), se observó solamente un incremento significativo en la producción de LTB₄, respecto de las células sin tratar ($p<0,01$).



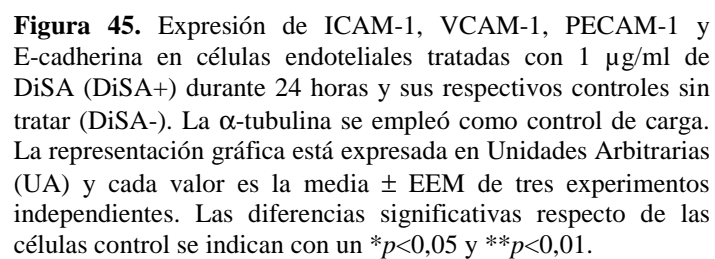


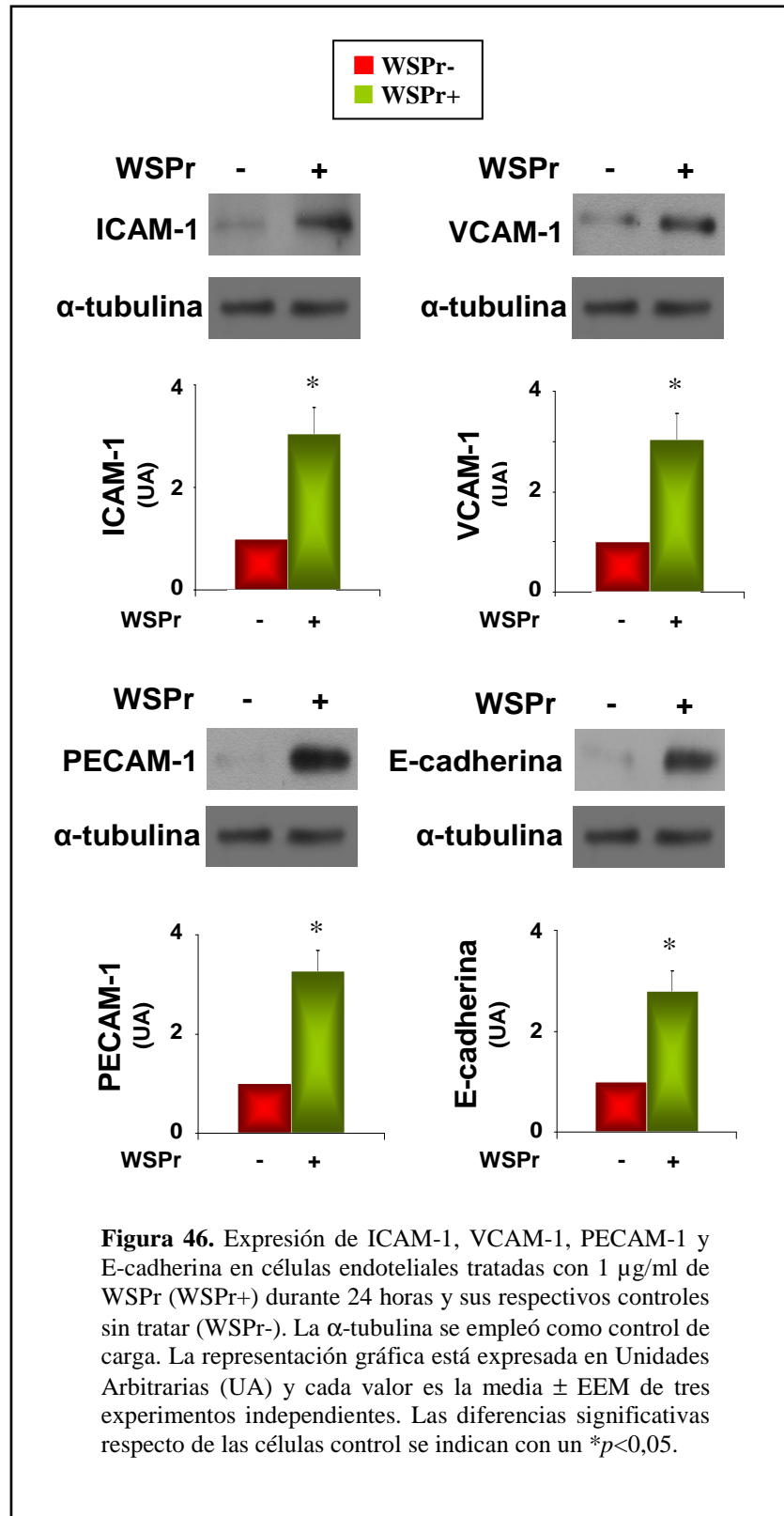
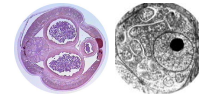
7.2. Efecto de DiSA y WSPr sobre las moléculas de adhesión del endotelio vascular.

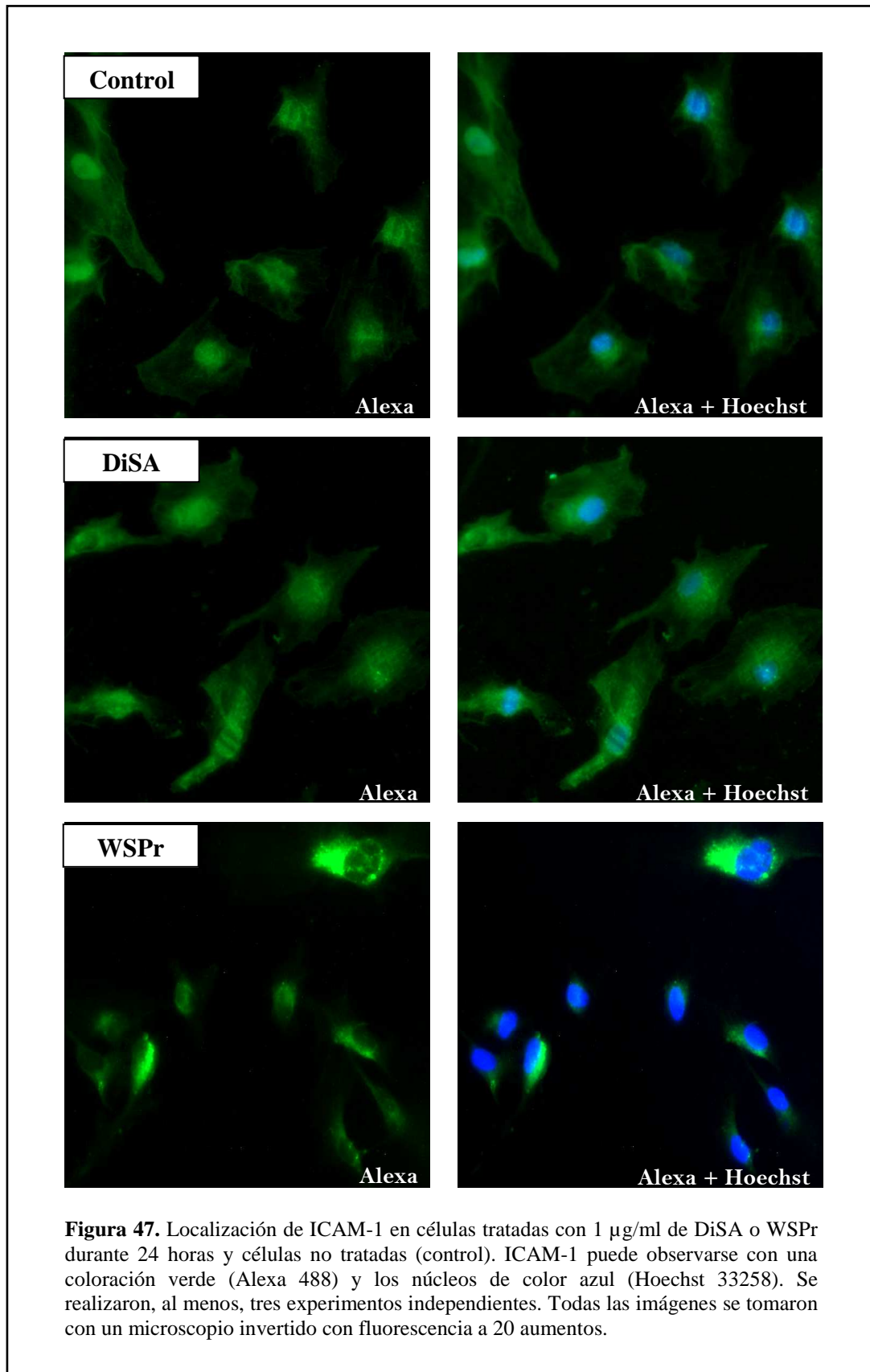
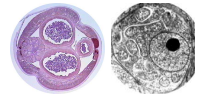
Las células endoteliales vasculares son responsables de la permeabilidad y la integridad vascular, entre otras funciones. Las moléculas de adhesión que se encuentran en sus membranas han sido implicadas en la regulación de dichas funciones. Nuestro objetivo fue estudiar si DiSA y WSPr producen algún efecto sobre algunas de las moléculas de membrana implicadas en estos procesos durante el proceso inflamatorio. Se analizó, mediante Western Blot, la expresión de ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1 y E-cadherina a partir de extractos proteicos provenientes de células endoteliales tratadas con 1 $\mu\text{g/ml}$ de DiSA o WSPr durante 24 horas comparando el efecto con cultivos sin tratar.

DiSA produjo un incremento significativo en la expresión de ICAM-1 ($p<0,05$) y PECAM-1 ($p<0,01$) pero no sobre la de VCAM-1 y E-cadherina (Figura 45). El tratamiento con WSPr indujo un aumento significativo de la expresión de las 4 moléculas ($p<0,05$ en todos los casos) (Figura 46).

También en este caso, se estudió la distribución celular de ICAM-1, VCAM-1 y PECAM-1 mediante inmunofluorescencia. No fue posible el estudio de la E-cadherina por no existir en el mercado un anticuerpo específico para su localización por inmunofluorescencia. Como se puede observar en las Figuras 47, 48 y 49, en células no tratadas, las moléculas ICAM-1, VCAM-1 y PECAM-1 se localizan en la zona perinuclear y con menor intensidad repartida por todo el citosol. En las células tratadas con DiSA o WSPr no se observó variación de la distribución en ninguna de las tres moléculas.







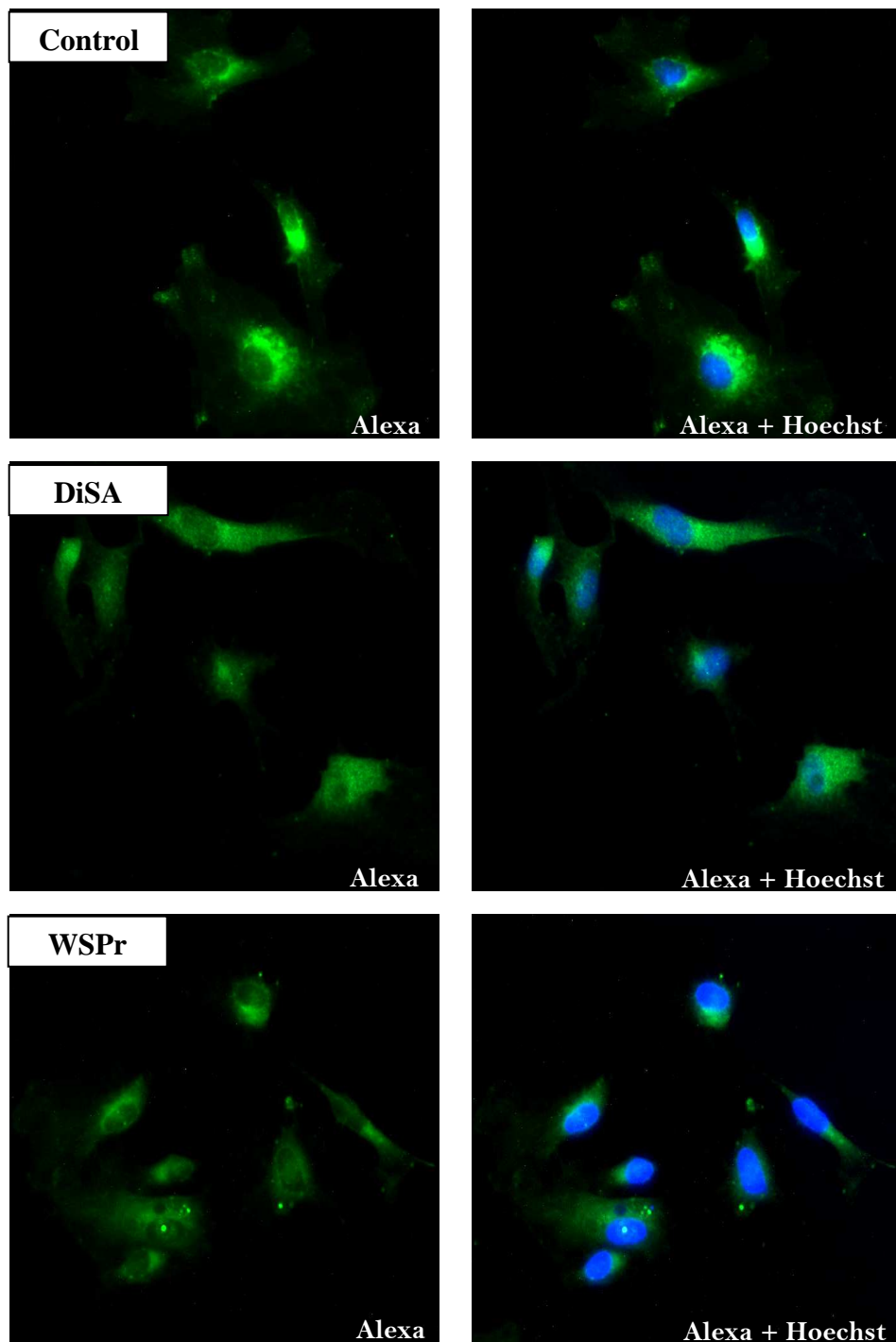
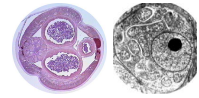


Figura 48. Localización de VCAM-1 en células tratadas con 1 $\mu\text{g/ml}$ de DiSA o WSPPr durante 24 horas y células no tratadas (control). ICAM-1 puede observarse con una coloración verde (Alexa 488) y los núcleos de color azul (Hoechst 33258). Se realizaron, al menos, tres experimentos independientes. Todas las imágenes se tomaron con un microscopio invertido con fluorescencia a 20 aumentos.

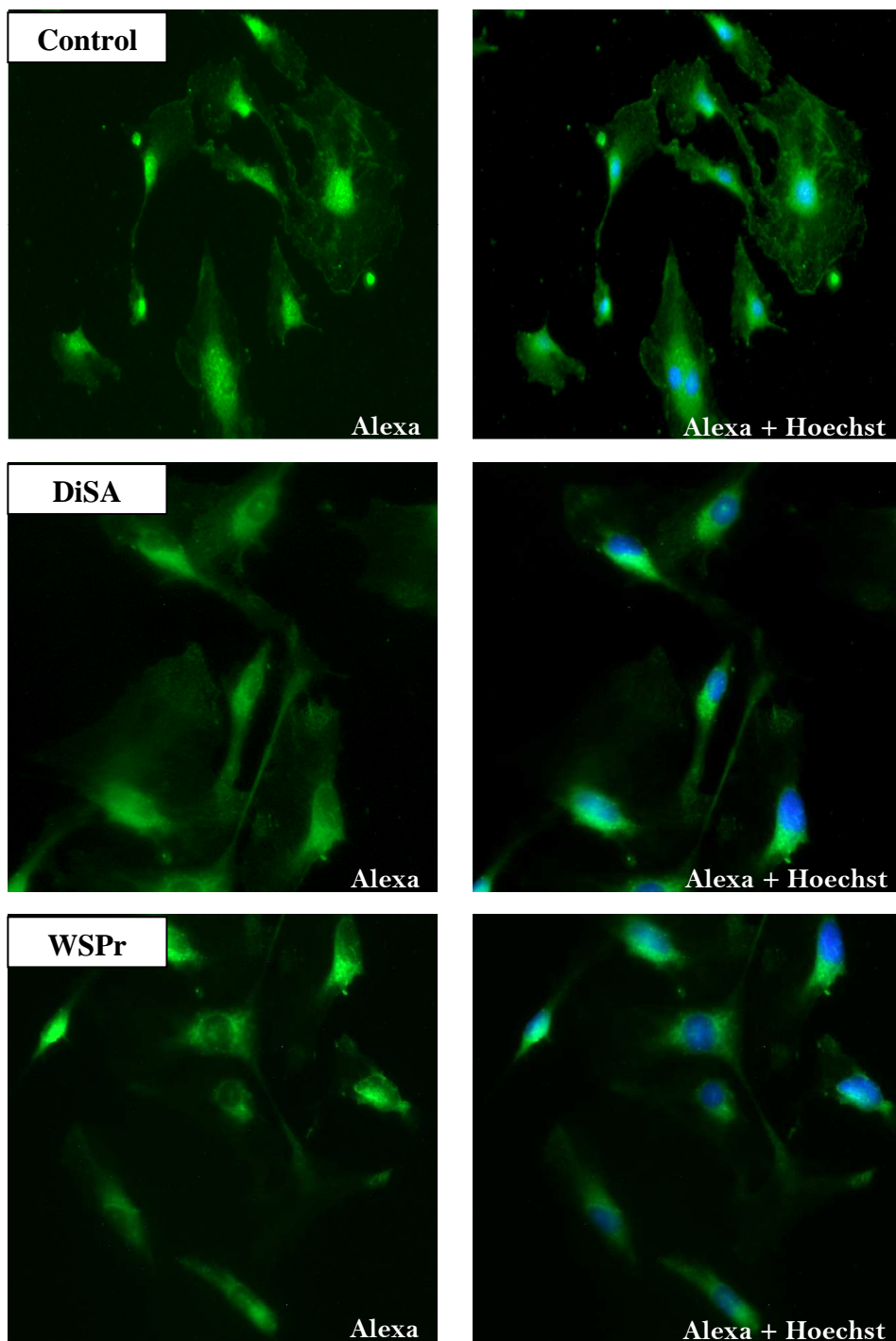
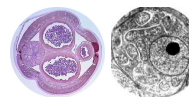
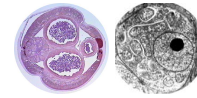


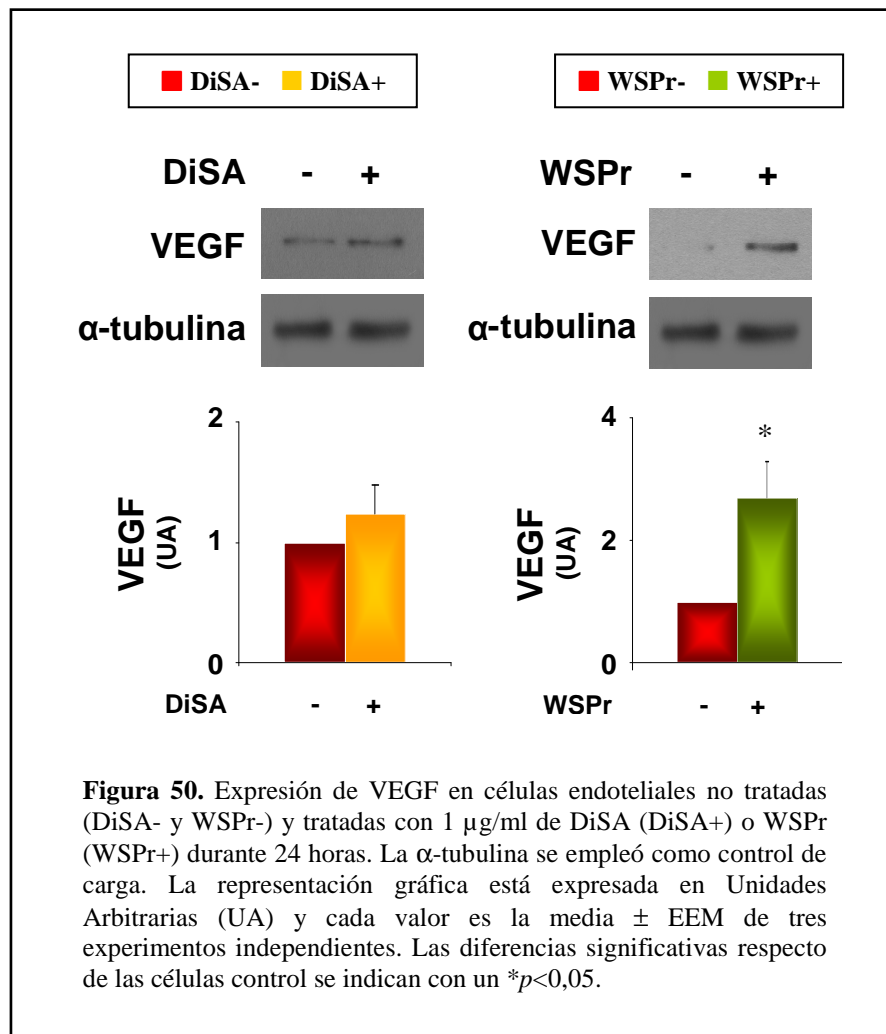
Figura 49. Localización de PECAM-1 en células tratadas con 1 $\mu\text{g/ml}$ de DiSA o WSPr durante 24 horas y células no tratadas (control). ICAM-1 puede observarse con una coloración verde (Alexa 488) y los núcleos de color azul (Hoechst 33258). Se realizaron, al menos, tres experimentos independientes. Todas las imágenes se tomaron con un microscopio invertido con fluorescencia a 20 aumentos.

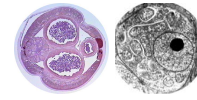


7.3. Efecto de DiSA Y WSPr sobre el nivel de expresión de VEGF.

Se estudió el efecto de DiSA y WSPr sobre el nivel de expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), relacionado con el control de la angiogénesis, la permeabilidad endotelial, el ciclo celular y la apoptosis. Su expresión se analizó mediante Western Blot en células endoteliales tratadas con 1 $\mu\text{g/ml}$ de DiSA o WSPr durante 24 horas y sus correspondientes controles (Figura 50).

La presencia de DiSA no produjo cambios significativos en el nivel de expresión de VEGF pero sí se observó un aumento moderado respecto de las células control. Sin embargo, WSPr sí indujo un incremento significativo de su expresión respecto de las células sin tratar ($p < 0,05$).

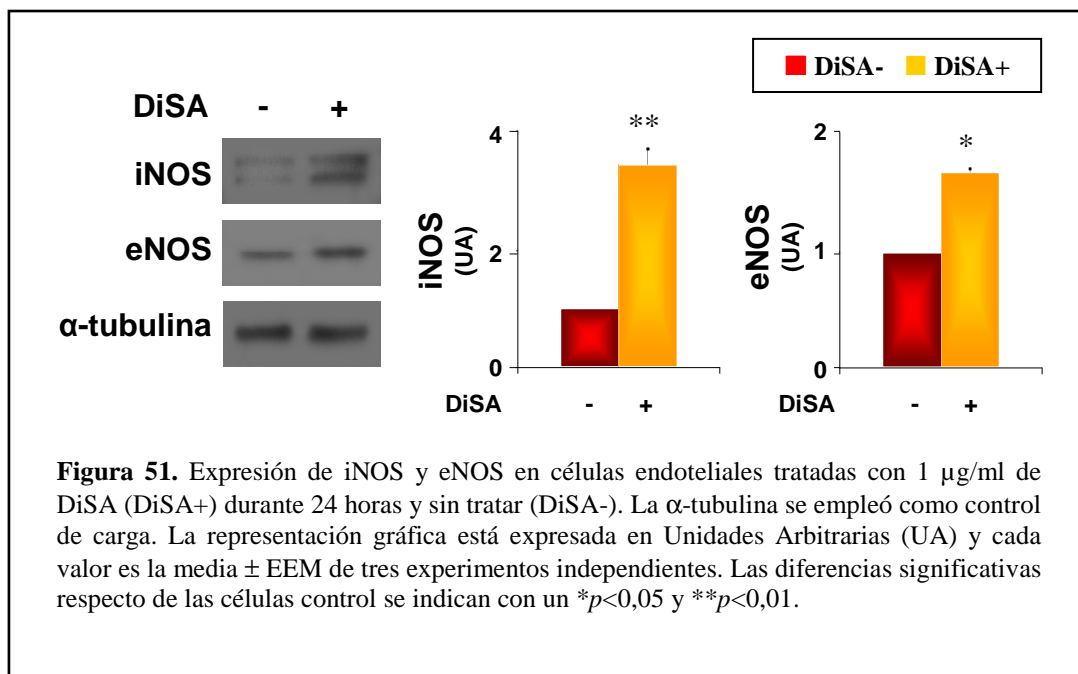


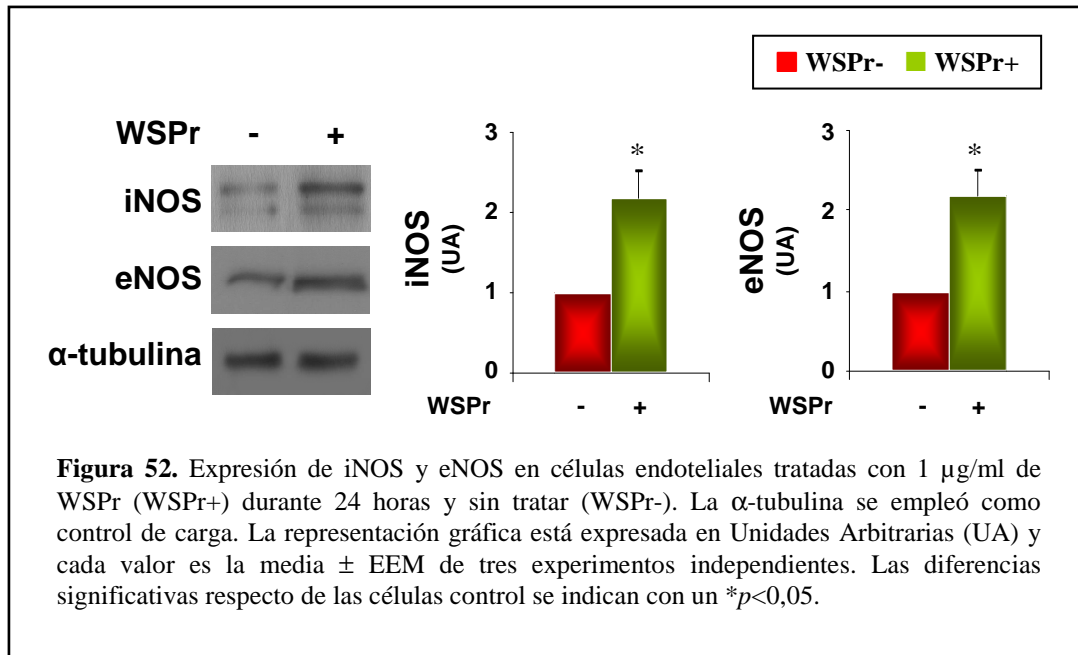
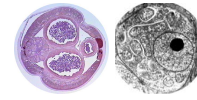


7.4. Efecto de DiSA y WSPr sobre eNOS e iNOS, enzimas responsables de la producción de óxido nítrico.

La óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) son 2 de las enzimas responsables de la producción de NO en las células endoteliales. Se estudió el efecto de DiSA y WSPr sobre eNOS e iNOS a partir de extractos proteicos procedentes de células endoteliales tratadas con 1 $\mu\text{g/ml}$ de DiSA durante 24 horas y no tratadas (control) mediante Western Blot (Figuras 51 y 52). Además, la producción de NO también fue analizada mediante un ELISA comercial en el medio de cultivo de dichos cultivos.

DiSA indujo un aumento significativo en la expresión de iNOS ($p<0,01$) y eNOS ($p<0,05$) respecto de las células control. La expresión de ambas enzimas también se vio incrementada significativamente en las células tratadas con WSPr ($p<0,05$ en ambos casos). No se detectó producción alguna de nitritos y nitratos ni en las células control ni en las células tratadas con DiSA o con WSPr.



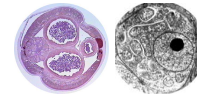


7.5. Efecto de DiSA y WSPr sobre la permeabilidad celular.

Para determinar el efecto de DiSA y WSPr sobre la permeabilidad endotelial se analizó la cantidad de dextrano marcado con FITC (FITC-dextrano) transferido a través de una monocapa de células endoteliales tratadas con 1 µg/ml de DiSA o WSPr en insertos *Transwell* de 0,33 cm² durante 24 horas y no tratadas. La fluorescencia emitida por parte del FITC- dextrano se midió en un fluorímetro en unidades de fluorescencia (UFE).

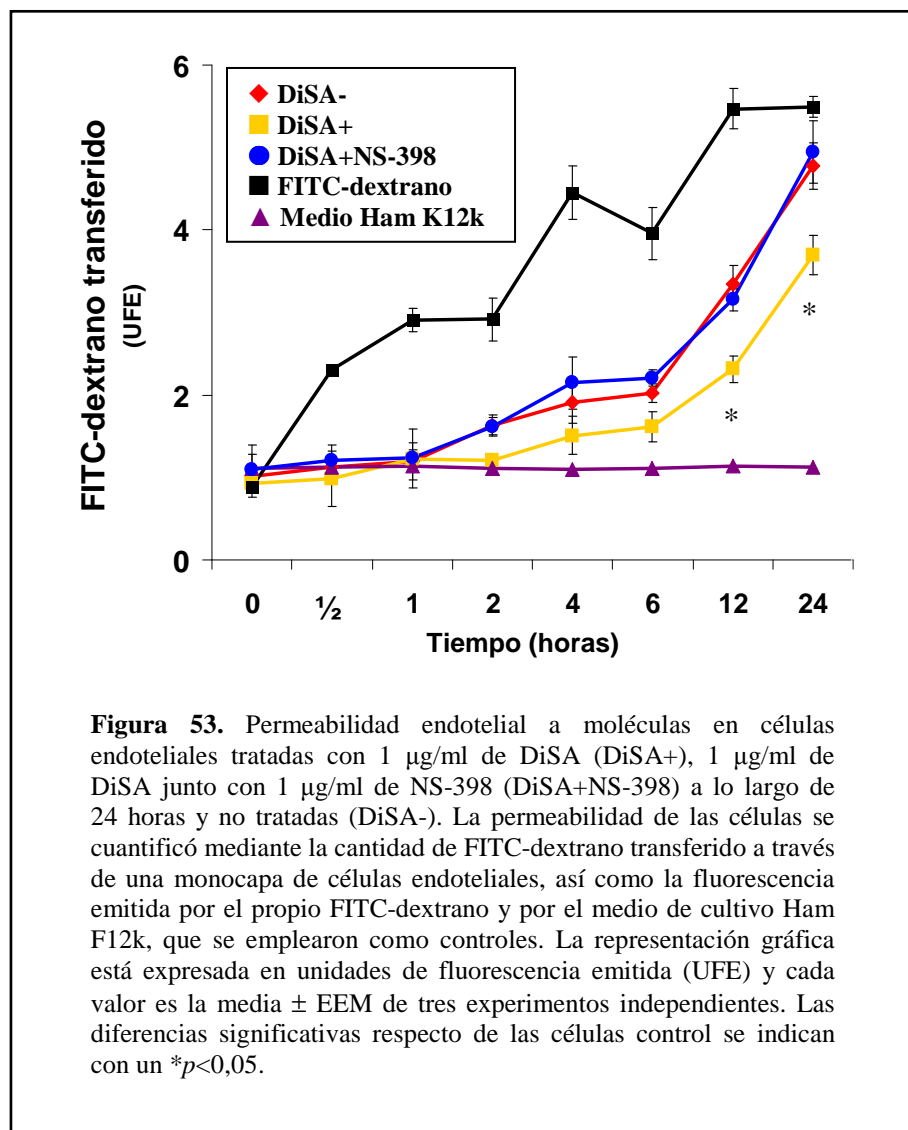
Durante la primera hora (Figura 53), la cantidad de FITC-dextrano transferido en los cultivos tratados con DiSA fue similar a la de los no tratados (control) no existiendo diferencias significativas entre ambos. Sin embargo, a partir de las 2 horas, se observó un descenso moderado, pero no significativo, de FITC-dextrano transferido en los cultivos tratados, que se mantuvo hasta las 6 horas. Este descenso aumentó de manera significativa a las 12 horas y fue máximo a las 24 horas ($p < 0,05$ en ambos casos).

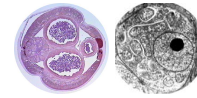
Como control interno del propio ensayo se midió la fluorescencia del propio FITC-dextrano, del transferido por los insertos sin células endoteliales y del medio Ham F12k durante 24 horas. La fluorescencia emitida durante 24 horas por el FITC-dextrano no varió obteniéndose valores medios próximos a 109 UFE en todos los puntos. No se



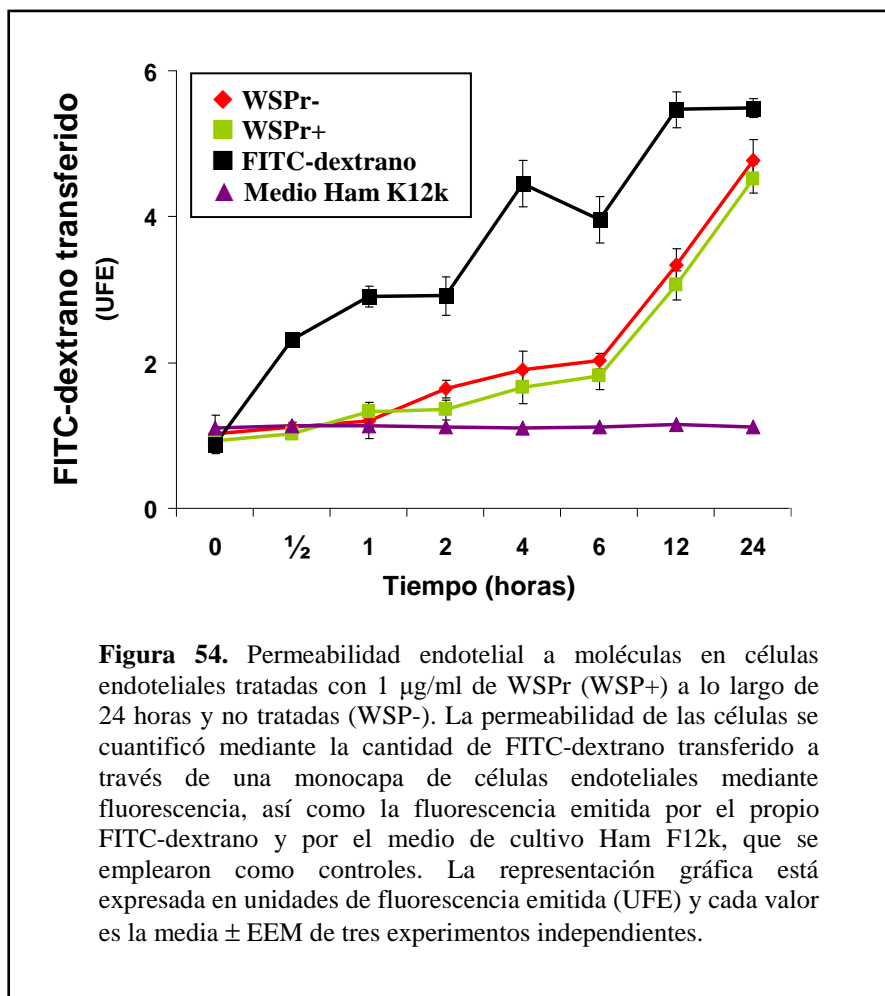
detectó fluorescencia del medio Ham F12k a lo largo de 24 horas y, por último, la fluorescencia emitida por el FITC-dextrano que atravesaba los propios insertos sin células aumentó progresivamente durante todo el estudio siendo sus valores muy superiores a los transferidos a través de los insertos con cultivos tratados y no tratados con DiSA.

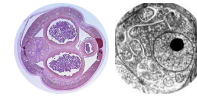
Cuando empleamos un inhibidor de COX-2 (NS-398) junto con el tratamiento con DiSA observamos que los valores obtenidos de FITC-dextrano transferido a través de la monocapa de células endoteliales descendieron siendo similares a los valores obtenidos en los cultivos sin tratar.





Con el tratamiento con WSPr (Figura 54), observamos un aumento progresivo de FITC-dextrano en la parte inferior de los insertos hasta las 6 horas, tanto en las células control como en las tratadas con WSPr. A las 12 horas, el paso de FITC-dextrano aumento sustancialmente hasta las 24 horas, siendo máxima en este punto. En ninguno de los tiempos analizadas se encontraron diferencias significativas, lo que demuestra, primero, que las células endoteliales sí son permeables a moléculas, y segundo, que el tratamiento de WSPr no afecta a la permeabilidad celular ya que no existen variaciones en la fluorescencia emitida por el FITC-dextrano entre las células control y las tratadas con WSPr. La fluorescencia emitida por el FITC-dextrano por sí sola, diluida en el medio Ham F12k, no varió a lo largo de todo el estudio (media de 111 UFE). La fluorescencia emitida por del medio Ham F12k, empleado para el cultivo de las células endoteliales, fue siempre similar en todos los tiempos en donde se analizó la fluorescencia emitida.

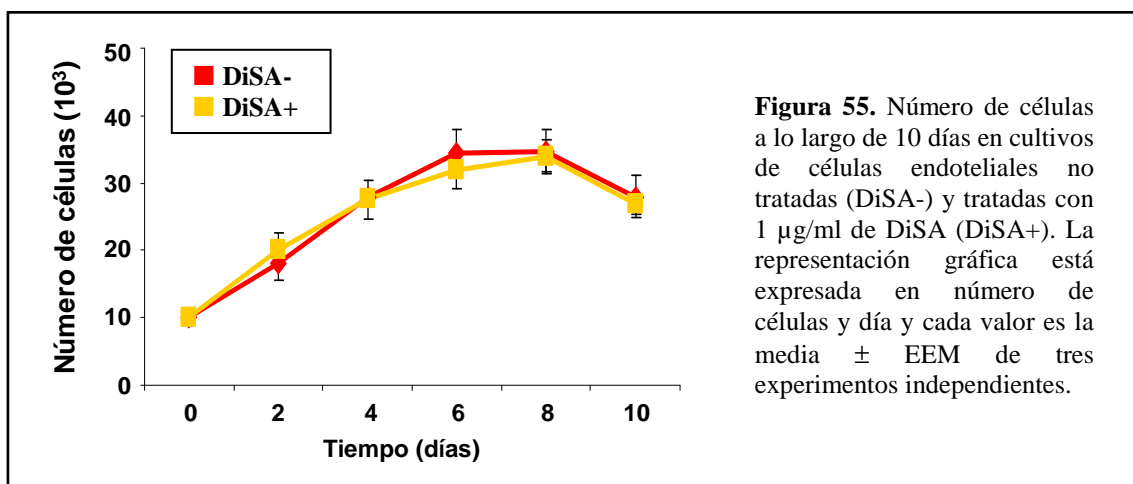




7.6. Efecto de DiSA y WSPr sobre la proliferación celular.

El efecto de DiSA y WSPr sobre la proliferación celular se estudió analizando el número de células viables producidas durante 10 días, el nivel de expresión de un antígeno nuclear de las células en fase de proliferación o *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) y el ciclo celular de las células endoteliales tratadas con 1 $\mu\text{g/ml}$ de DiSA o WSPr durante 24 horas y no tratadas. El recuento del número de células viables a lo largo de 10 días se analizó mediante la técnica de cristal violeta, la expresión de PCNA mediante Western Blot a partir de extractos proteicos procedentes de células endoteliales tratadas y no tratadas y, el ciclo celular por citometría de flujo.

El número de células viables en los cultivos de células endoteliales no tratados y en los tratados con DiSA aumentó a lo largo de los 8 primeros días descendiendo el décimo. Con el tratamiento con WSPr, aumentó durante los 6 primeros días y, a partir de ahí, descendió. No se encontraron diferencias significativas entre las células tratadas con DiSA (Figura 55) o con WSPr (Figura 56) y sus correspondientes controles sin tratar. En la expresión de PCNA tampoco se observaron diferencias significativas entre las células tratadas y sin tratar (Figura 57). Por último, ninguno de los dos tratamientos con DiSA o WSPr modificaron significativamente el porcentaje de células en las fases G_0G_1 y $S+G_2M$ en comparación con los cultivos no tratados (Figuras 58 y 59 respectivamente). Para este último estudio se emplearon como control positivo cultivos de células endoteliales tratados con 1 y 10 $\mu\text{g/ml}$ de LPS. Sorprendentemente, ninguna de las dos concentraciones modificaron significativamente dichos porcentajes pero sí aumentó significativamente el porcentaje de células necróticas (ver apartado 7.7).



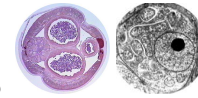


Figura 56. Número de células a lo largo de 10 días en cultivos de células endoteliales no tratadas (WSPr-) y tratadas con 1 $\mu\text{g/ml}$ de WSPr (WSPr+). La representación gráfica está expresada en número de células y día y cada valor es la media \pm EEM de tres experimentos independientes.

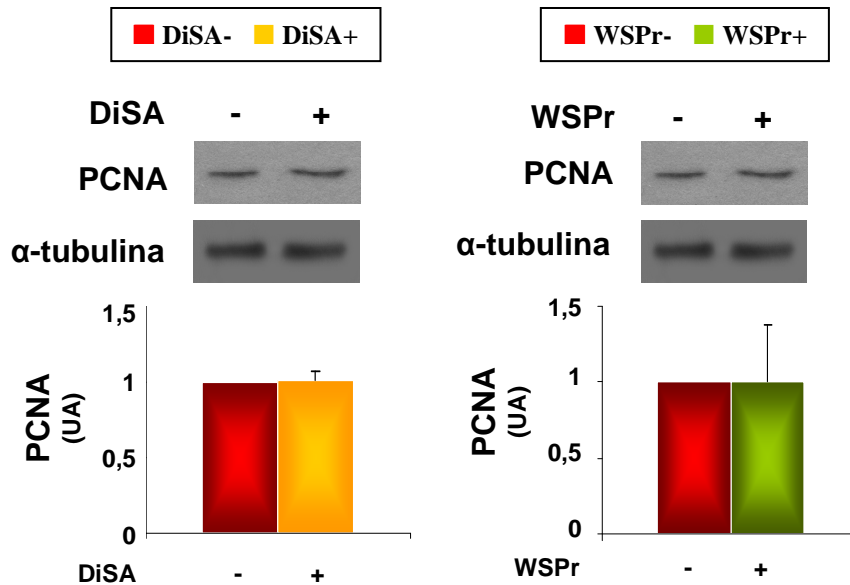
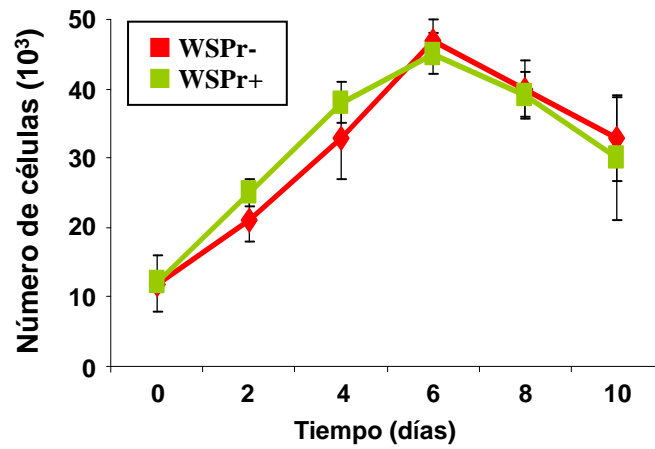


Figura 57. Expresión de PCNA en células endoteliales no tratadas (DiSA- o WSPr-) y tratadas con 1 $\mu\text{g/ml}$ de DiSA (DiSA+) o WSPr (WSPr+) durante 24 horas. La α -tubulina se empleó como control de carga. La representación gráfica está expresada en Unidades Arbitrarias (UA) y cada valor es la media \pm EEM de tres experimentos independientes.

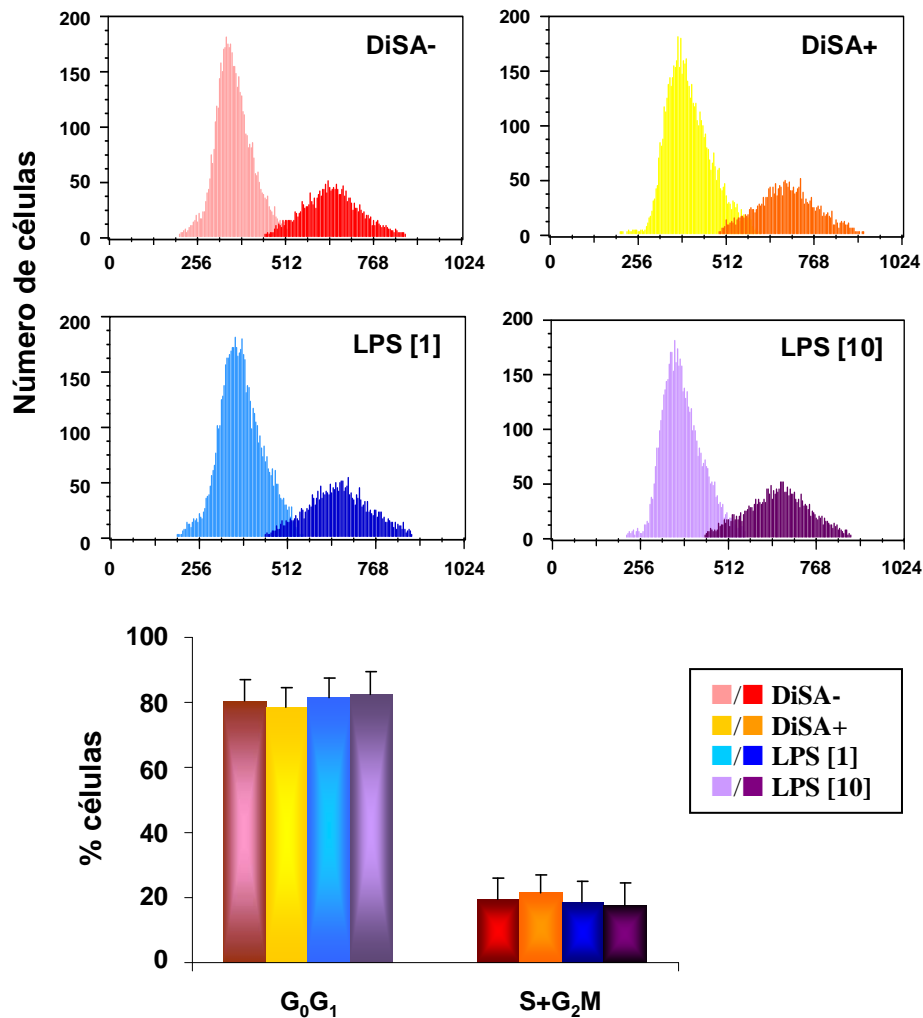
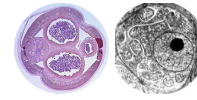
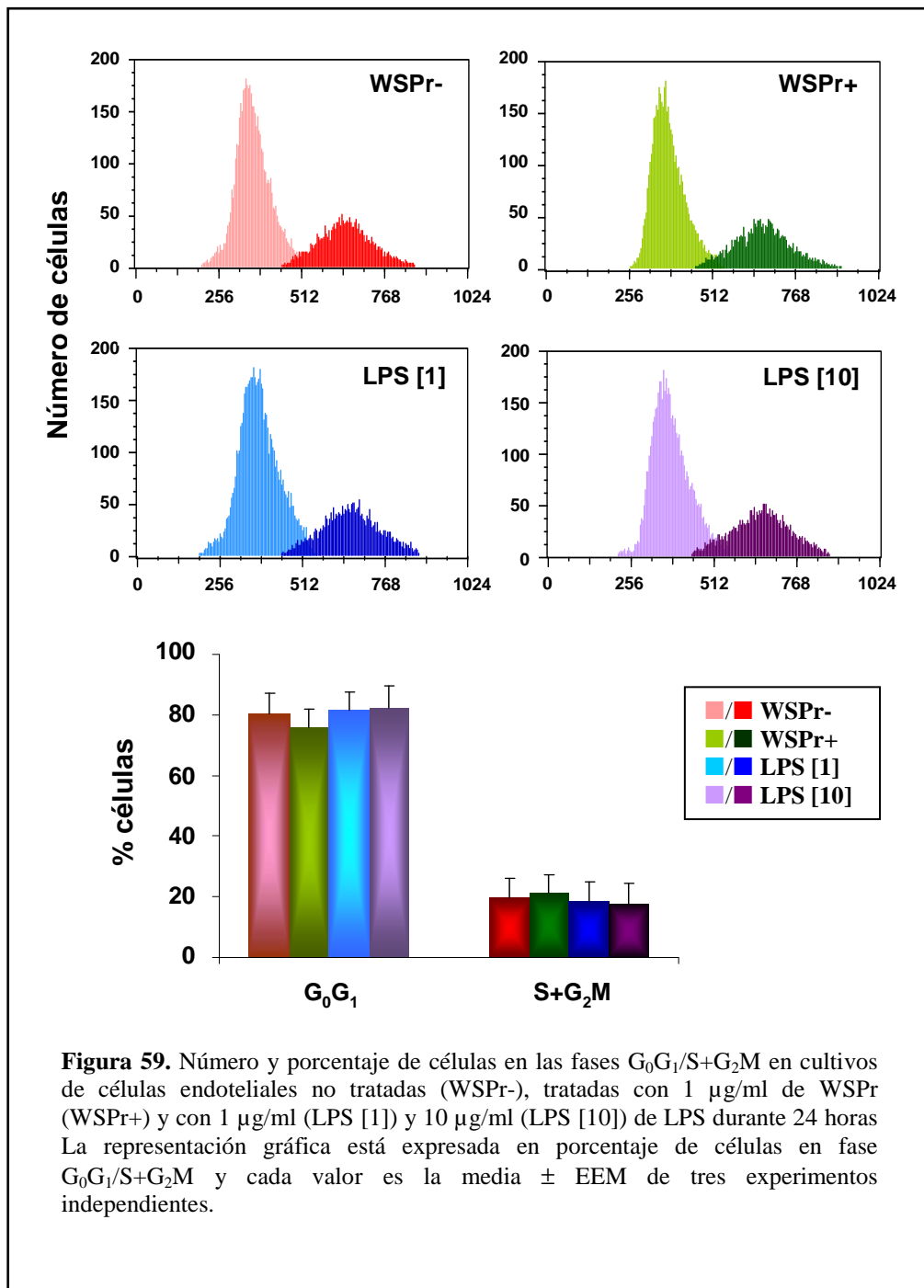
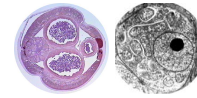
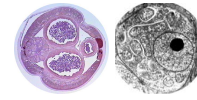


Figura 58. Número y porcentaje de células en las fases G₀G₁/S+G₂M en cultivos de células endoteliales no tratadas (DiSA-), tratadas con 1 µg/ml de DiSA (DiSA+) y con 1 µg/ml (LPS [1]) y 10 µg/ml (LPS [10]) de LPS durante 24 horas. La representación gráfica está expresada en porcentaje de células en fase G₀G₁/S+G₂M y cada valor es la media ± EEM de tres experimentos independientes.

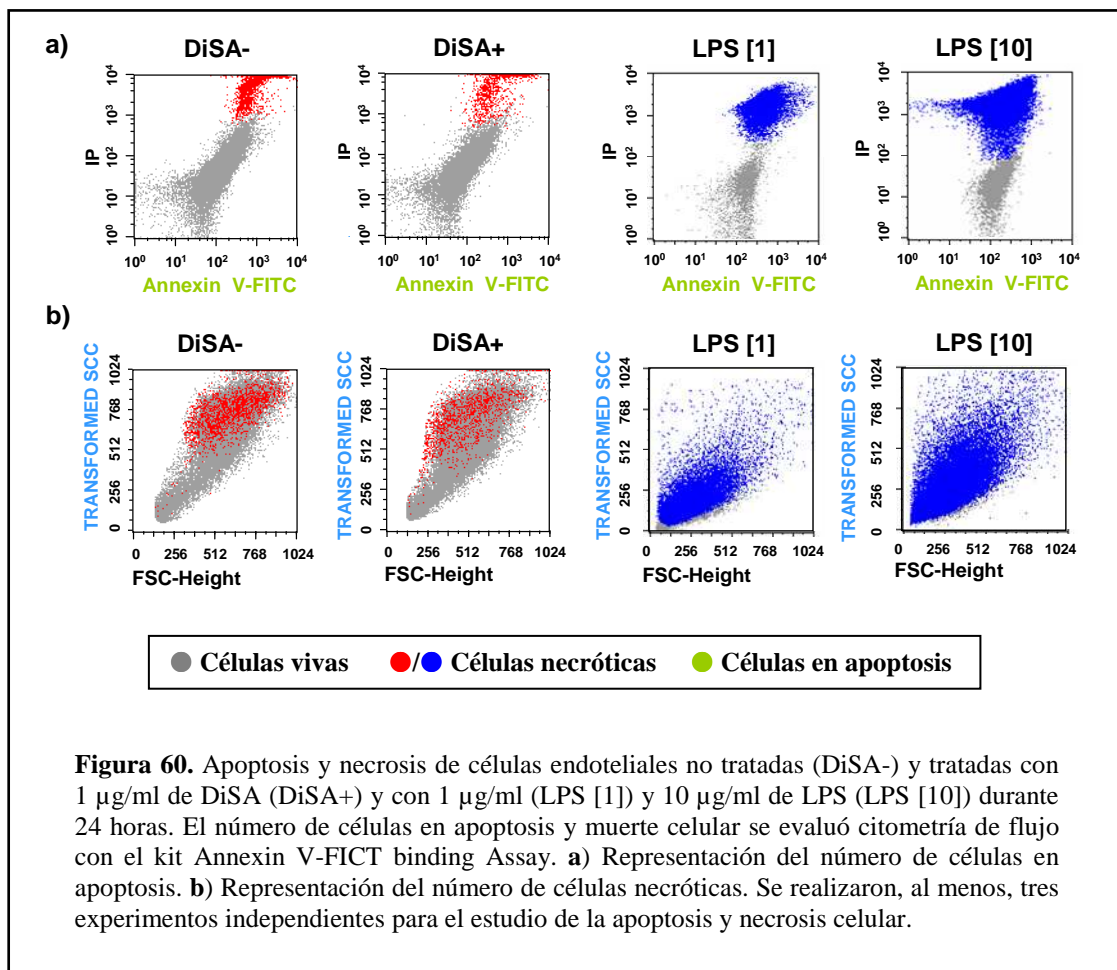


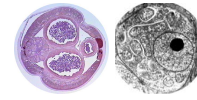


7.7. Efecto de DiSA y WSPr sobre la apoptosis y necrosis celular.

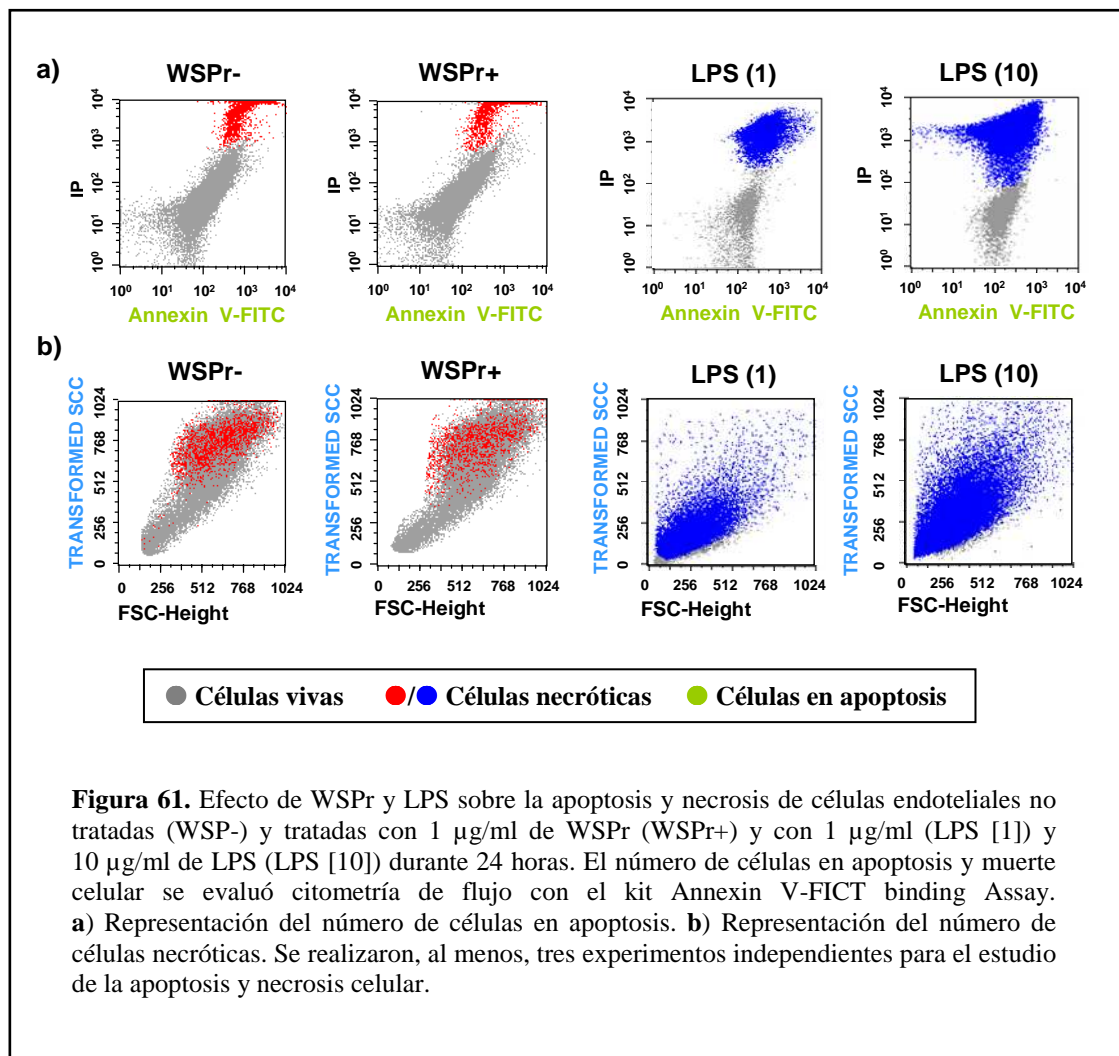
Se estudió el efecto de DiSA y WSPr sobre la apoptosis y necrosis celular en cultivos de células endoteliales tratados con 1 $\mu\text{g/ml}$ de DiSA o WSPr durante 24 horas y no tratados mediante citometría de flujo con el kit Annexin V-FICT *binding Assay*. Además, los cultivos de células endoteliales fueron tratados con dos concentraciones de LPS (1 y 10 $\mu\text{g/ml}$), que se emplearon como control positivo.

En los cultivos tratados con DiSA y WSPr se observó un ligero descenso, aunque no significativo, del porcentaje de células necróticas ($6,70 \pm 3,24\%$ y $7,61 \pm 4,13\%$, respectivamente) en comparación con los cultivos sin tratar ($9,31 \pm 5,97\%$) (Figura 60 y 61).



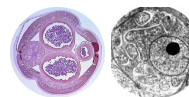


En ningún caso se detectaron células apoptóticas. En los cultivos de células endoteliales tratadas con LPS, a medida que aumentó su concentración, se incrementó significativamente el número de células necróticas ($63 \pm 17,67\%$ y $82,6 \pm 21,78\%$ con 1 y 10 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente).



7.8. Efecto de DiSA y WSPr sobre la migración celular.

Se estudió el efecto de DiSA y WSPr sobre la capacidad de migración de las células endoteliales mediante la técnica del *Wound Healing*. En una monocapa de células endoteliales confluentes tratadas con 1 $\mu\text{g/ml}$ de DiSA o WSPr y no tratadas se



realizaron varias heridas paralelas horizontal y verticalmente de forma simultánea y se controló el tiempo que tardaba en cerrarse los dos frentes formados por la herida. Tanto en los cultivos control (Figura 62) como en los cultivos tratados con DiSA (Figura 63) o con WSPr (Figura 64), el primer contacto entre los dos frentes se produjo a las 3 horas y 30 minutos, cerrándose completamente la herida a las 6 horas y 25 minutos.

Para analizar estadísticamente el efecto de ambos tratamientos sobre la migración celular en comparación con las células sin tratar, medimos el espacio entre los frentes celulares en el momento en el que realizamos la herida (0 horas) y 4 horas después. Este período es lo suficientemente amplio, sin que la herida no se haya cerrado del todo, como para minimizar, al máximo, los errores en las mediciones. El porcentaje de la distancia de migración en las heridas realizadas en los cultivos sin tratar fue de $35,21 \pm 10,99\%$, en los tratados con DiSA fue de $33,29 \pm 4,11\%$ (Figura 65) y por último, en los tratados con WSPr fue de $31,86 \pm 11,49\%$ (Figura 66). Estos datos muestran que no existen diferencias significativas en el porcentaje de migración entre ambos tratamientos y las células control, pero sí un descenso moderado en los cultivos tratados.

Al ver que no existían diferencias significativas entre los cultivos no tratados y tratados quisimos ver si dichos tratamientos provocaban un cambio en la disposición de los filamentos de actina del citoesqueleto, hecho que indicaría una desorganización de los ejes de las células endoteliales. Estudiamos su distribución en los frentes de migración durante 4 horas de todos los cultivos mediante las técnicas de *Wound Healing* e inmunofluorescencia. Observamos que los filamentos de actina estaban distribuidos de manera uniforme pero aleatoria tanto en las células endoteliales sin tratar como en las células tratadas con DiSA o WSPr, lo que indica que los tratamientos tampoco afectan a la orientación de los ejes celulares (Figura 67).

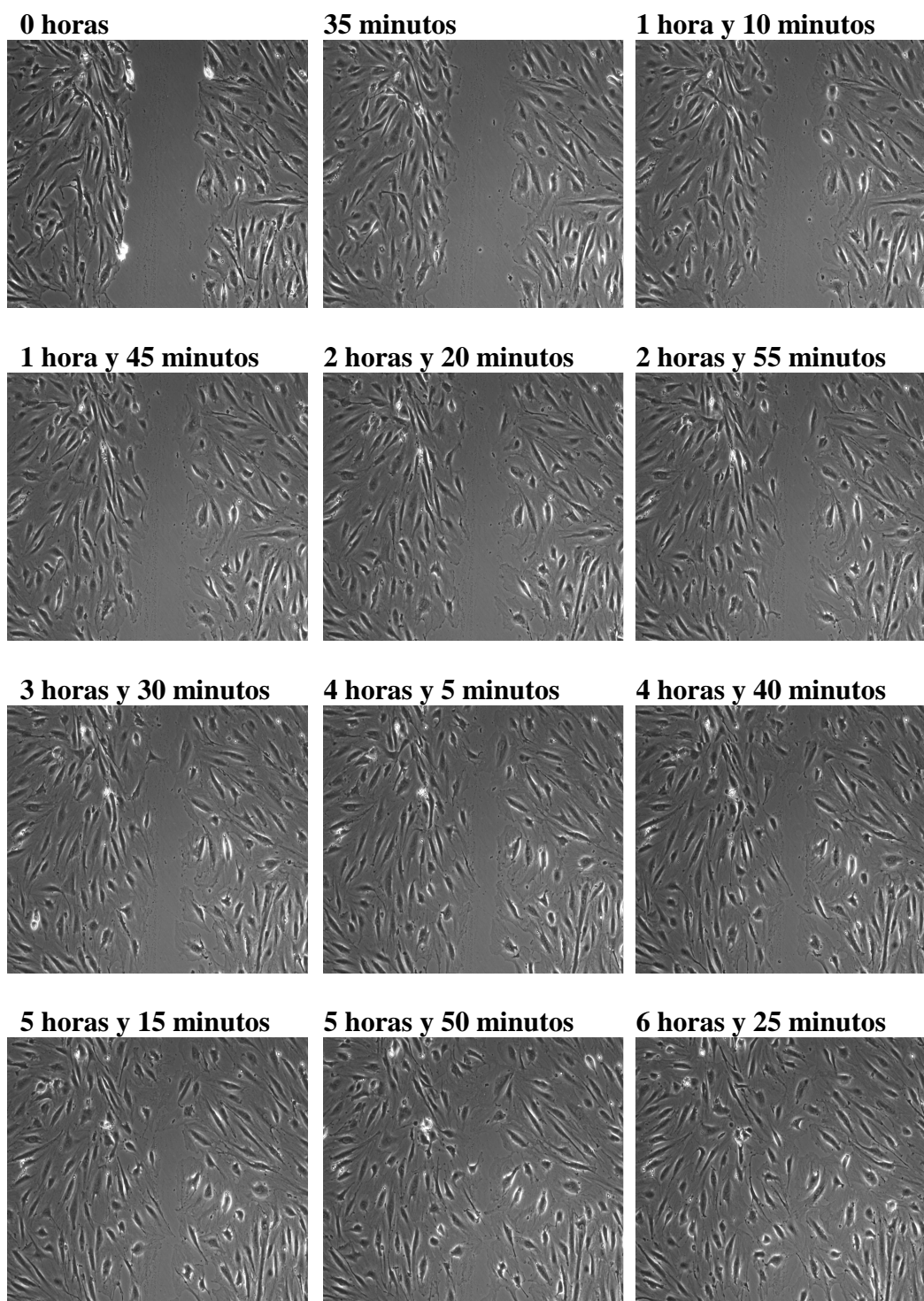
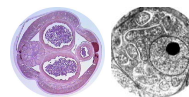


Figura 62. Migración de células endoteliales sin tratar a lo largo de 6 horas y media después de haber producido una herida vertical sobre una monocapa celular en, al menos, tres experimentos independientes.

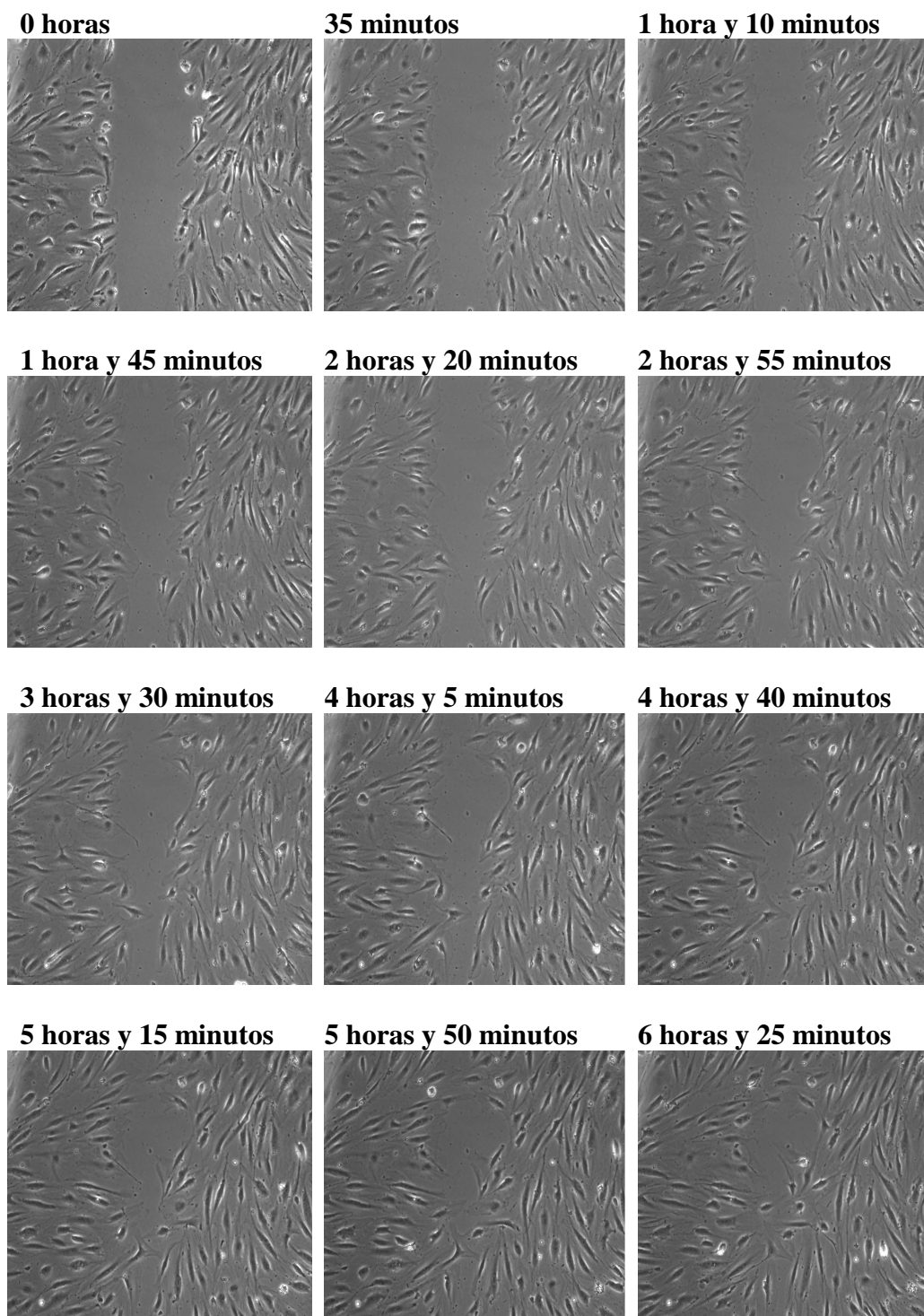
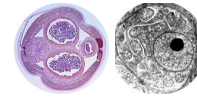


Figura 63. Migración de células endoteliales tratadas con $1\mu\text{g/ml}$ de DiSA a lo largo de 6 horas y media después de haber producido una herida vertical sobre una monocapa celular en, al menos, tres experimentos independientes.

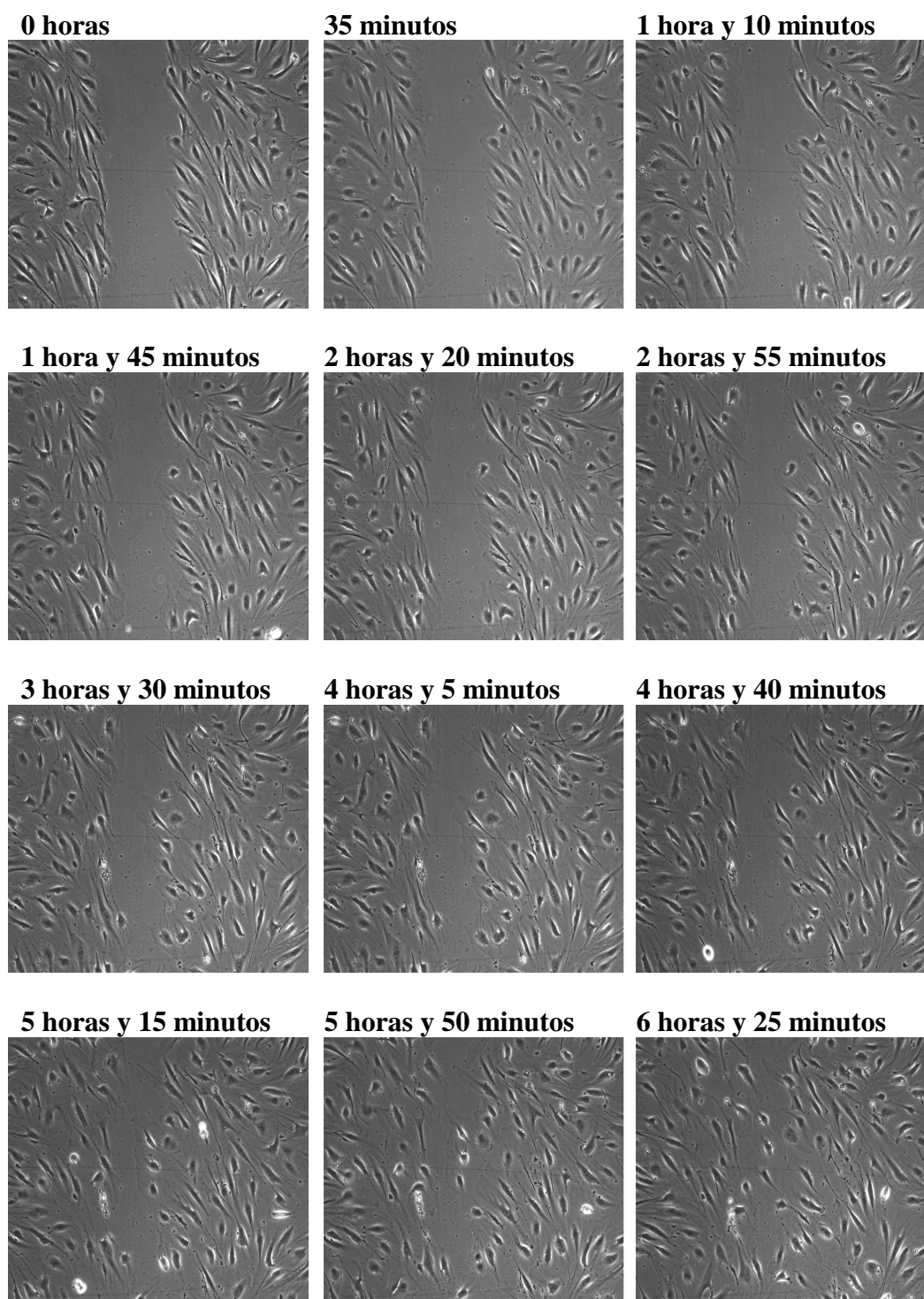
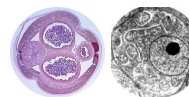


Figura 64. Fotografías representativas de la migración de células endoteliales tratadas con $1\mu\text{g/ml}$ de WSPPr a lo largo de 6 horas y media después de haber producido una herida vertical sobre una monocapa celular en, al menos, tres experimentos independientes.

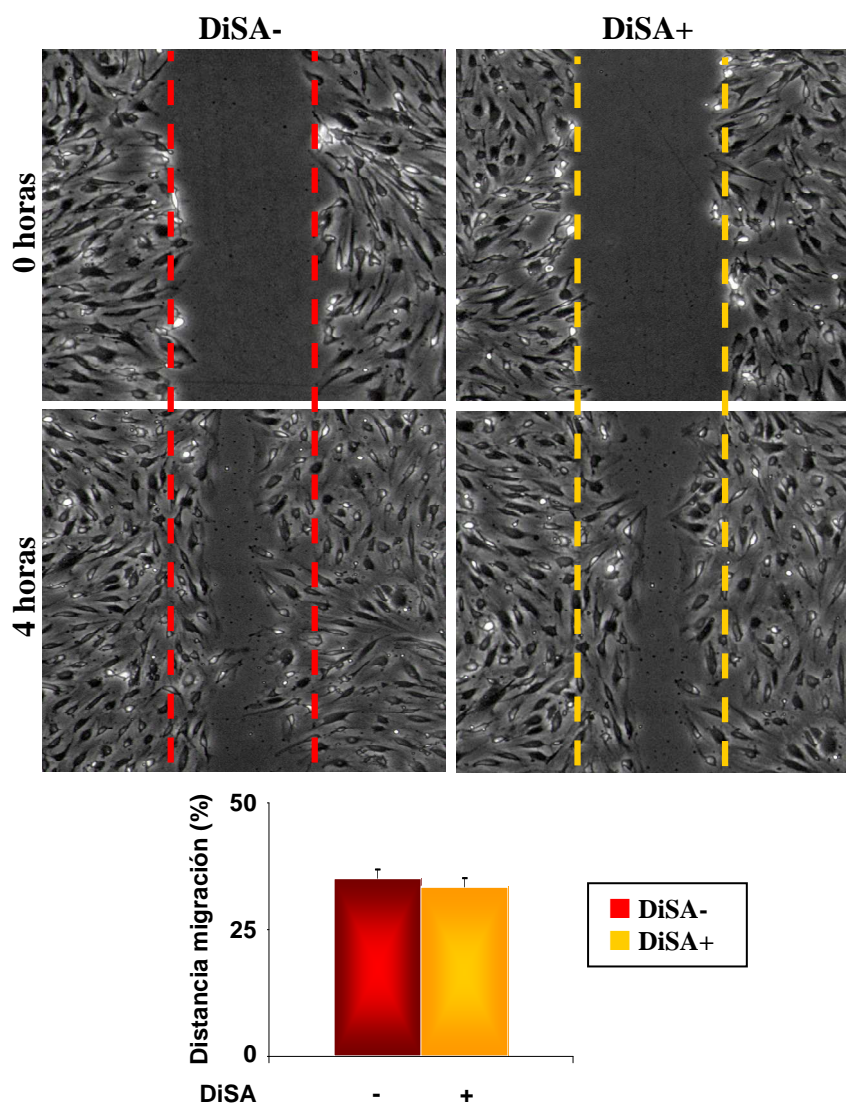
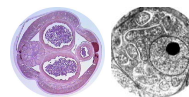


Figura 65. Fotografías representativas y representación gráfica del efecto de DiSA sobre la migración de células endoteliales no tratadas (DiSA-) y tratadas con 1 μ g/ml de DiSA (DiSA+) durante 4 horas. La distancia de migración está expresada como el porcentaje de migración medio \pm EEM de tres experimentos independientes.

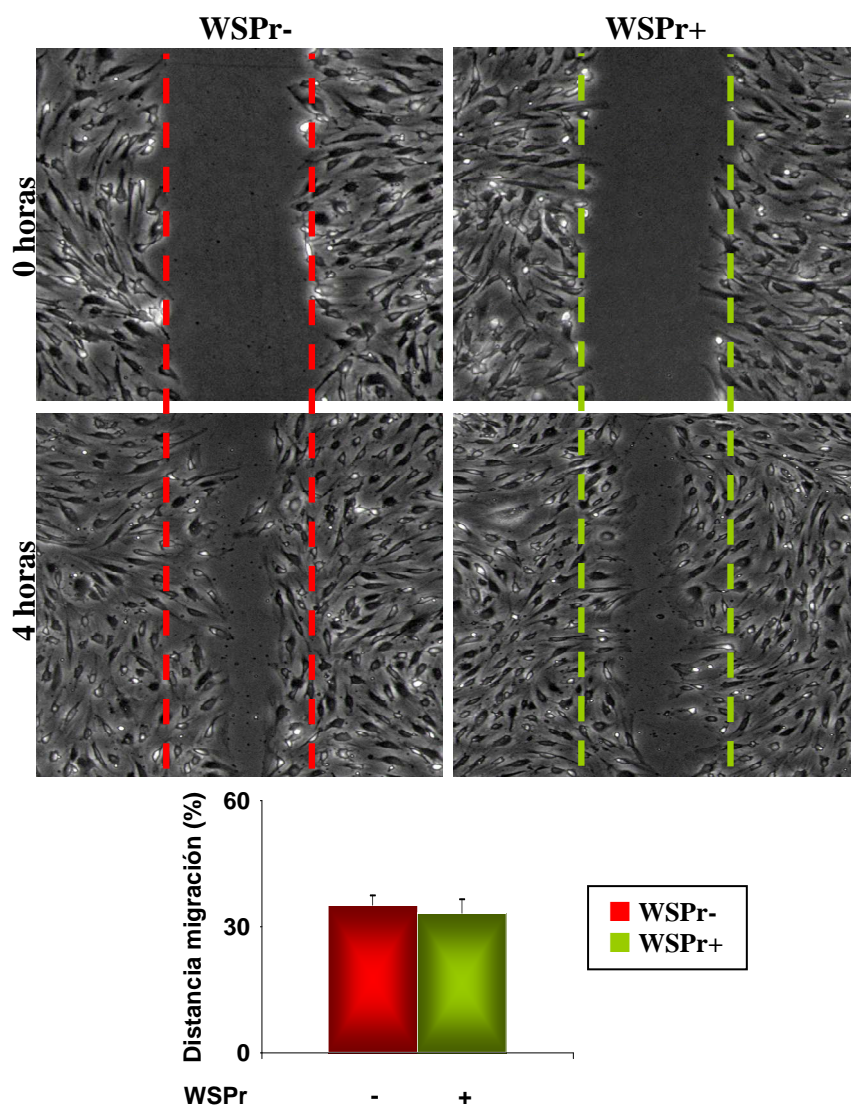
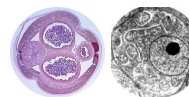


Figura 66. Fotografías representativas y representación gráfica del efecto de WSPr sobre la migración de células endoteliales no tratadas (WSPr-) y tratadas con 1 μ g/ml de WSPr (WSPr+) durante 4 horas. La distancia de migración está expresada como el porcentaje de migración medio \pm EEM de tres experimentos independientes.

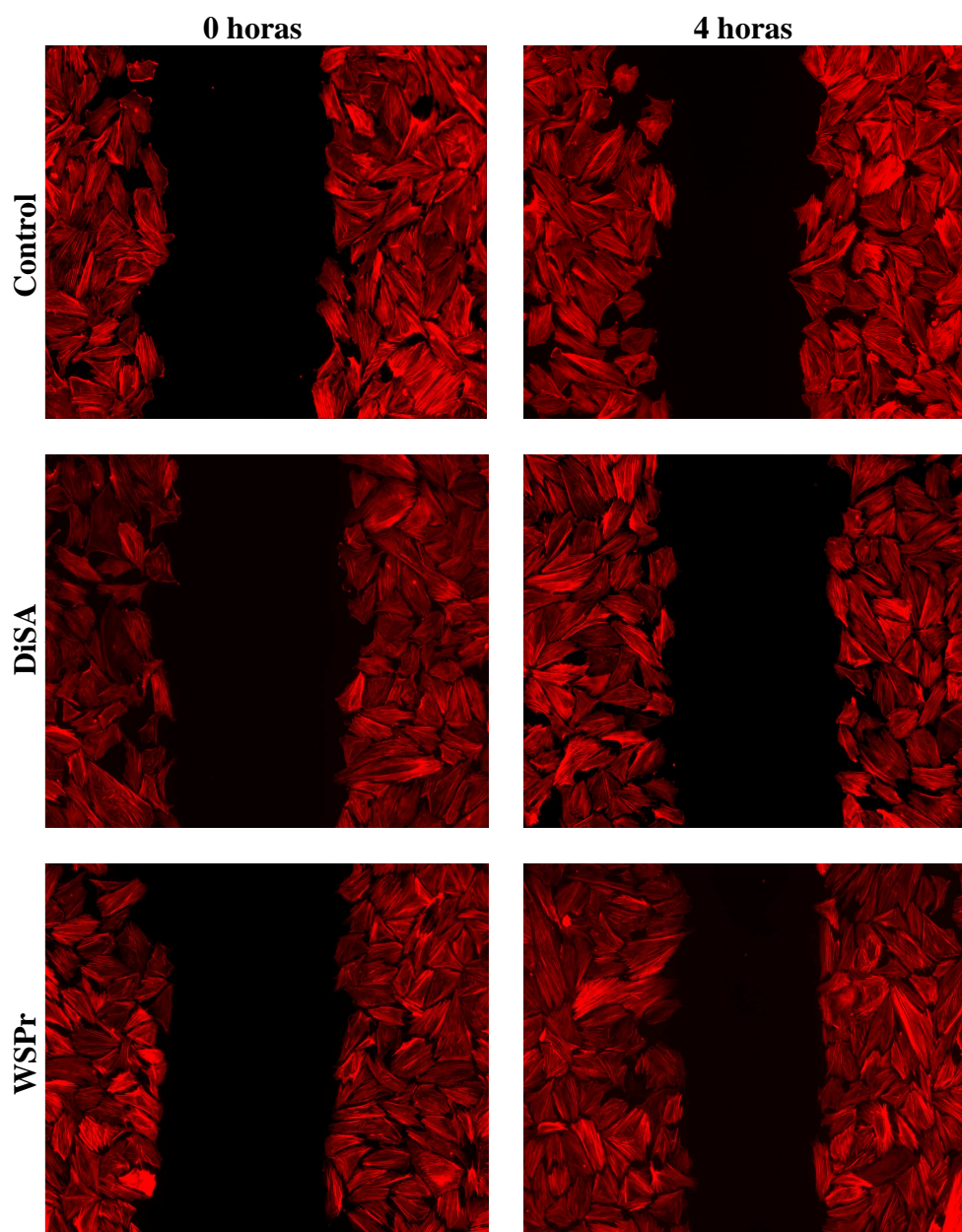
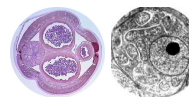
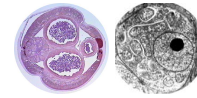


Figura 67. Imágenes representativas de la disposición de los filamentos de actina durante la migración de células endoteliales tratadas con $1\mu\text{g/ml}$ de DiSA o WSPr durante 4 horas de, al menos, tres experimentos independientes,



7.9. Resumen de los efectos de DiSA y WSPr sobre las células endoteliales vasculares durante 24 horas.

	DiSA	WSPr
Citotoxicidad	= Ausencia	= Ausencia
Enzimas del metabolismo del ácido araquidónico	= COX-1 ↑ COX-2 ↑ 5-LO	= COX-1 ↑ COX-2 ↑ 5-LO
Eicosanoides	↑ PGE ₂ = TxB ₂ ↑ LTB ₄	↑ PGE ₂ = TxB ₂ = LTB ₄
Moléculas de adhesión	↑ ICAM-1 = VCAM-1 ↑ PECAM-1 = E-cadherina	↑ ICAM-1 ↑ VCAM-1 ↑ PECAM-1 ↑ E-cadherina
NO	↑ eNOS ↑ iNOS	↑ eNOS ↑ iNOS
VEGF	= VEGF	↑ VEGF
Permeabilidad a moléculas	↓ Descenso	= No se modifica
Proliferación	= No se modifica	= No se modifica
Apoptosis y necrosis	= No se modifica	= No se modifica
Migración	= No se modifica	= No se modifica

Tabla 13. Similitudes y deferencias de los efectos de DiSA y WSPr sobre células endoteliales vasculares durante 24 horas.

Dirofilaria immitis es el agente causal de la dirofilariosis cardiopulmonar que afecta principalmente a perros y gatos de todo el mundo. El hecho de que altere la salud de mascotas apreciadas por el hombre, junto con la gravedad de las lesiones que produce, determina que sea una enfermedad muy importante desde el punto de vista veterinario.

La dirofilariosis tiene, generalmente, un curso crónico. Las primeras alteraciones patológicas ocurren en las arterias pulmonares, inmediatamente después de la llegada de los vermes adultos. Después aparecen los daños pulmonares, y sólo en los últimos estadios de la enfermedad se produce la afección cardíaca. Además de este desarrollo previsible, pueden aparecer procesos agudos como tromboembolismos y endarteritis, que ponen en riesgo inmediato la vida de los pacientes, cuando ocurre la muerte de vermes adultos, espontánea o inducida por un tratamiento filaricida (Venco, 2007a). Los mecanismos patogénicos son muy complejos y no se han estudiado en su totalidad. Los daños se han atribuido a procesos mecánicos y obstructivos causados principalmente por los vermes adultos alojados en las arterias pulmonares u otras localizaciones, a los productos eliminados por las filarias y a la respuesta inmune e inflamatoria del hospedador (Venco & Vezzoni, 2001; Mupanomunda et al., 1997).

El *redescubrimiento* de las bacterias endosimbiontes del género *Wolbachia* en numerosas especies de filarias, incluidas *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *Onchocerca volvulus* y *D. immitis* (Bandi et al., 1998), ha impulsado la investigación para determinar el papel que juegan estos microorganismos en la respuesta inmune y en la patología inflamatoria de las filariosis. En la actualidad existen evidencias, obtenidas mediante técnicas moleculares, inmunológicas e inmunohistoquímicas, de que los hospedadores entran en contacto con *Wolbachia* después de la muerte de las filarias (Bazzocchi et al., 2000; Punkosdy et al., 2001; Keiser et al., 2002; Brattig et al., 2002; Marcos-Atxutegi et al., 2003; Simón et al., 2003b; Kramer et al., 2005). Este contacto podría ser el responsable de la similitud entre algunos signos y síntomas que aparecen en las filariosis, y las manifestaciones clínicas asociadas con infecciones bacterianas (Keiser et al., 2002).

Por lo que se refiere a las reacciones inflamatorias asociadas a la dirofilariosis, los datos existentes se deben a investigaciones realizadas sobre algunas moléculas y células sanguíneas implicadas en el proceso inflamatorio, tanto en hospedadores

infectados naturalmente como en modelos experimentales, y han sido mayoritariamente realizadas por nuestro grupo. Los datos obtenidos indican que los hospedadores infectados o inmunizados con *D. immitis* desarrollan una respuesta inmune dual Th₁/Th₂ (Marcos-Atxutegi et al., 2003; Kramer et al., 2005). La respuesta de tipo Th₁, proinflamatoria, es estimulada por *Wolbachia* y la tipo Th₂, antiinflamatoria, se dirige preferentemente contra los antígenos de *D. immitis* (Marcos-Atxutegi et al., 2003; Morchón et al., 2007b y c). En las infecciones caninas, las microfilarias parecen implicadas en el estímulo de la respuesta Th₂, mientras que en las infecciones ocultas y en las humanas (que son siempre amicrofilarémicas), se detecta una respuesta Th₁ contra *Wolbachia* (Morchón et al., 2007c; Simón et al., 2005). Otros autores han demostrado que los macrófagos y los neutrófilos son las células clave en la respuesta inflamatoria contra las filarias (Brattig et al., 2000 y 2001). *Wolbachia* estimula la quimiotaxis de los neutrófilos (Bazzocchi et al., 2003), e inhibe su apoptosis, prolongando así el estímulo inflamatorio (Bazzocchi et al., 2007).

Sin embargo, existen muy pocos datos sobre otros aspectos de la patología inflamatoria de la dirofilariosis, como son la producción de eicosanoides y la influencia de los antígenos del parásito y de la bacteria simbiote sobre el endotelio vascular, a pesar de que este tejido es el que está en contacto directo con los vermes y las moléculas que producen y/o liberan, tanto cuando están vivos, como cuando mueren.

1. Los eicosanoides en las infecciones naturales por *D. immitis*.

La inflamación es un proceso complejo que está regulado inicialmente, entre otras moléculas, por prostaglandinas (PGs), tromboxanos (TxS), y leucotrienos (LTs). Cada uno de estos eicosanoides tiene unos efectos reguladores diferentes en el proceso inflamatorio: la PGE₂ estimula la producción de una respuesta antiinflamatoria de tipo Th₂ y causa vasodilatación; el TxB₂ favorece la respuesta Th₁ proinflamatoria y produce vasoconstricción y el LTB₄ tiene un efecto quimiotáctico sobre los leucocitos (Betz & Fox, 1991; Sala & Folco, 2001).

Se ha observado la presencia de PGE₂ en la filariosis linfática (Liu & Weller, 1992; Liu et al., 1992) y en la oncocercosis (Brattig et al., 2006), pero estos son los primeros datos obtenidos en infecciones causadas por *D. immitis*.

El primer paso para la realización de esta parte de la tesis fue la caracterización de los hospedadores de los que procedían las muestras de sueros incluidas en el estudio, dada la importancia de esta selección para la obtención de datos fiables. La dirofilariosis afecta a diversos hospedadores e, en cada uno de ellos, la enfermedad puede progresar y manifestarse de distintas formas. La situación clínica de cada hospedador en un momento dado está función de factores relacionados con el parásito (número, localización, etc...) y de factores inherentes al hospedador (edad, tamaño, estado fisiológico). Por ello, es preciso caracterizar adecuadamente la situación parasitológica y clínica de las muestras incluidas en el estudio.

Nuestros resultados demuestran que *D. immitis* estimula la producción de eicosanoides tanto en las personas como en los reservorios animales. En la fase crónica de las infecciones naturales humanas, caninas y felinas, durante la que se manifiestan los signos inflamatorios típicos de la dirofilariosis, el eicosanoide dominante es el TxB_2 , responsable de la vasoconstricción, agregación plaquetaria, y estimulación de la respuesta de tipo Th_1 proinflamatoria. En los tres hospedadores también aparece LTB_4 , estimulador de la quimiotaxis de leucocitos. Sin embargo, la PGE_2 , responsable de vasodilatación y estímulo de la respuesta Th_2 , está presente en niveles mucho menores que el TxB_2 y el LTB_4 en la dirofilariosis canina y felina, y no aparece en la dirofilariosis humana. La PGE_2 aparece solamente en la fase inicial de la infección, como se demuestra en las infecciones experimentales de gatos.

En la dirofilariosis canina se han detectado PGE_2 , TxB_2 y LTB_4 . Los niveles de todos ellos son significativamente más elevados en las infecciones microfilarémicas que en las amicrofilarémicas. Previamente hemos demostrado que las infecciones microfilarémicas presentan siempre una expresión de citoquinas y una respuesta de anticuerpos (tanto Th_1 como Th_2), más intensa que las infecciones amicrofilarémicas, contra los antígenos de *D. immitis* y contra los de *Wolbachia* (Kramer et al., 2005; Morchón et al., 2007c). Dado que *Wolbachia* es expulsada al torrente circulatorio, tanto por los vermes adultos como por las microfilarias que mueren progresivamente, nuestros datos sugieren que los altos niveles de TxB_2 podrían estar asociados, al menos en parte, al reciclaje natural de las microfilarias, más que a la presencia de estas.

En los gatos, generalmente, no existe microfilaremia. Sin embargo, se observa también un incremento de la producción de eicosanoides, respecto de los gatos sanos.

Los más abundantes son el TxB_2 y el LTB_4 , mientras que los niveles de PGE_2 son muy inferiores. El estudio realizado en gatos infectados experimentalmente a lo largo de 6 meses, demuestra la existencia de una regulación de los eicosanoides durante el desarrollo de la dirofilariosis felina. Hasta los 60 días p.i., el eicosanoide que presenta los niveles más altos es la PGE_2 , al contrario de lo que ocurre en los gatos infectados naturalmente, en la fase crónica de la enfermedad, en los que predominan el TxB_2 y el LTB_4 . La PGE_2 ha sido relacionada con mecanismos que facilitan la supervivencia de las filarias por sus efectos vasodilatadores y la inducción de una respuesta de tipo Th_2 (Liu et al., 1992; Brattig et al., 2006). El hecho de que sus niveles más altos se observen durante la primera fase de la infección, podría estar relacionado con la supervivencia de las larvas y preadultos durante la fase crítica inicial de la infección. Al final del estudio (180 días p.i.), los niveles de TxB_2 y LTB_4 fueron más elevados que los de PGE_2 , y similares a los observados en gatos con infección crónica natural, debido, probablemente al desarrollo de las reacciones inflamatorias características de la fase crónica y la regulación negativa cruzada existente entre TxB_2 y PGE_2 .

La muerte de las larvas, inducida por el tratamiento con ivermectina, modifica los patrones de producción de PGE_2 y LTB_4 , pero no los de TxB_2 . La asociación de la PGE_2 a mecanismos de supervivencia de los parásitos, tal como se ha señalado anteriormente, parece acorde con los elevados niveles de dicho eicosanoide encontrados durante la primera fase de la infección en gatos, mientras los vermes están vivos, y que parece seguir estimulada por moléculas liberadas inmediatamente después de la muerte parasitaria, desapareciendo cuando este estímulo deja de estar presente. El incremento inicial de LTB_4 , días después de la administración de la ivermectina, podría reflejar la liberación de *Wolbachia* por los vermes que son destruidos por el medicamento. Estos resultados concuerdan con los datos obtenidos *in vitro* en los que el tratamiento de células endoteliales con la molécula dominante de la pared de *Wolbachia* (WSPr) da lugar a la producción de LTB_4 . Así, demostramos que *Wolbachia* es responsable directa del aumento de este mediador celular, que en las fases de muerte parasitaria mediará en los procesos descritos en estas circunstancias en individuos con infecciones, como son la inflamación (aumento de permeabilidad vascular) y la migración celular hacia la zona afectada (efecto quimiotáctico). Estas observaciones son coincidentes con las manifestadas por otros autores que señalan a *Wolbachia* como estimulador de la

quimiotaxis de neutrófilos (Bazzocchi et al., 2003) y la aparición de fenómenos inflamatorios exacerbados durante la muerte de las filarias (Taylor et al., 2000; Brattig et al., 2004). Posteriormente el nivel de LTB_4 disminuye, probablemente como consecuencia de la desaparición de los antígenos de *Wolbachia* y el consiguiente cese del estímulo.

Los altos niveles de TxB_2 , encontrados en individuos con dirofilariosis pulmonar, se correlacionan con los hechos que ocurren durante la formación de los nódulos pulmonares. La inflamación y la obstrucción de las arterias, característicos de la dirofilariosis humana, se deben, probablemente, al estímulo vasoconstrictor y de agregación plaquetaria que ejerce el TxB_2 (Davi et al., 1997). Nosotros hemos detectado previamente una única respuesta de anticuerpos IgG_1 (Th_1 en humanos) contra la WSPr de *Wolbachia*, en individuos con dirofilariosis pulmonar (Marcos-Atxutegi et al., 2004), y grandes concentraciones de células inflamatorias dentro y alrededor de los vermes en nódulos subcutáneos, en zonas donde se observaron cúmulos de las bacterias endosimbiontes (Grandi et al., en prensa). Otros autores han demostrado que durante el shock séptico, se produce un considerable incremento del TxB_2 intravascular (Ball et al., 1986). Todos estos datos sugieren que, en la dirofilariosis humana, la producción de TxB_2 podría estar asociada a la liberación de las bacterias simbiotes *Wolbachia*, durante la destrucción de los vermes y la consiguiente formación de los nódulos.

2. Actividad del extracto somático de *D. immitis* (DiSA) y la molécula dominante de la superficie de *Wolbachia* (WSPr) sobre células endoteliales vasculares.

Las razones para la realización de este estudio han sido que, como se ha comentado anteriormente, a pesar de la interacción existente entre los vermes y sus moléculas por una parte, y las células del endotelio vascular por otro, prácticamente no existen datos sobre la influencia que ejerce *D. immitis* sobre las células endoteliales. Por otra parte, la liberación masiva de productos antigénicos cuando mueren los vermes adultos, determina la aparición de una patología aguda que supone un riesgo inmediato muy importante para la vida de los animales infectados, cuya correcta comprensión puede ayudar a su adecuada prevención.

El estímulo antigénico ejercido sobre el endotelio vascular ha sido investigado sólo en algunas parasitosis como la tripanosomosis americana (Girard et al., 2005),

malaria (Ockenhouse et al., 1992) y esquistosomosis (Oswald et al., 1994). Sin embargo, esta es la primera vez que se analiza el efecto directo del extracto antigénico de una filaria, incluida la bacteria endosimbionte *Wolbachia*, sobre células endoteliales vasculares. Para llevar a cabo nuestra investigación, fue necesaria la puesta a punto de un modelo experimental basado en el cultivo *in vitro* de células endoteliales vasculares y del establecimiento de las condiciones óptimas de estimulación con los antígenos empleados. El primer paso fue la elección del tipo celular para el modelo. Se eligió la línea de células endoteliales vasculares humanas HAAE-1 por diferentes motivos. En primer lugar, *D. immitis* está en contacto con el endotelio vascular y el hombre es uno de los hospedadores de *D. immitis*. Por otra parte, cuando se iniciaron los estudios no existía una línea de células endoteliales vasculares de perros o gatos en el mercado. En cualquier caso, y muy probablemente, el comportamiento *in vitro* frente a determinados estímulos, de las células endoteliales vasculares empleadas, debe ser muy similar a las de otros mamíferos, por lo que nuestros resultados podrían ser extrapolados a los hospedadores habituales de *D. immitis*. Es necesario señalar la trascendencia de la puesta a punto de este modelo, ya que es la base para estudiar en profundidad los mecanismos patogénicos que ocurren a nivel vascular en la dirofilariosis cardiopulmonar.

Una vez mantenida y expandida la línea celular seleccionada, todos los experimentos se realizaron en fase 6, momento de máxima expansión del cultivo en el que las células mantienen sus propiedades fisiológicas óptimas. Por último, la concentración óptima de los antígenos DiSA y WSPr, empleada para el tratamiento de las células a lo largo de los experimentos, se eligió teniendo en cuenta el efecto sobre la expresión de las enzimas eNOS, COX-1 y COX-2. Estas tres moléculas se expresan en todas las células endoteliales vasculares. Además eNOS y COX-1 son constitutivas del endotelio vascular (Nuszkowski et al., 2001; Bogatcheva et al., 2005). También se tuvo en cuenta la ausencia de efecto citotóxico sobre las células endoteliales vasculares HAAE-1 a la concentración elegida para el tratamiento.

Para reproducir las condiciones que ocurren cuando los vermes adultos mueren en las arterias pulmonares de los hospedadores infectados, tratamos los cultivos de células endoteliales vasculares con un extracto antigénico de adultos de *D. immitis* (DiSA). Nuestros resultados demuestran que el DiSA no produce efectos citotóxicos

durante las primeras 24 horas de tratamiento, lo que nos permite trabajar con este modelo, ni altera procesos fisiológicos básicos, tales como la proliferación y migración y no produce necrosis o apoptosis. Estos hechos tienen una gran importancia, ya que demuestran que el antígeno de las filarias no mata las células, sino que produce cambios selectivos que darán lugar a la patología de la enfermedad causada por las mismas. Demostramos aquí, por primera vez, que tanto DiSA como WSPr son capaces de estimular directamente la producción de determinados mediadores celulares de las células endoteliales vasculares que están directamente relacionados con la patología observada en hospedadores naturales. Medimos y demostramos así la influencia real, a nivel molecular, de los estímulos parasitarios sobre las células del hospedador que se encuentran en inmediato contacto con el parásito.

DiSA induce modificaciones en la expresión de moléculas relacionadas con los mecanismos inflamatorios, como la COX-2, 5-LO, PGE₂ y LTB₄, y las enzimas responsables de la síntesis de NO, eNOS e iNOS, mientras que comprobamos que el mismo extracto parasitario no induce variaciones en los niveles de TxB₂. El efecto inmediato de la producción de estas moléculas se manifestaría dando lugar a vasodilatación y a la respuesta de tipo Th₂ (COX-2→PGE₂) (Betz & Fox, 1991; Birukova et al., 2007), así como a la atracción de distintas células por quimiotaxis (5-LO→TxB₂) a la zona donde muere el parásito, dando lugar, al inicio de los procesos patogénicos tras la liberación de los antígenos del parásito muerto. La ausencia de TxB₂, probablemente asociada a una regulación negativa por la presencia de altos niveles de PGE₂ (Sala & Folco, 2001), demuestra que los fenómenos asociados a las primeras horas tras la destrucción parasitaria, no inducirían la vasoconstricción (TxB₂), sino que ésta se produciría más tarde, tal y como demuestra la presencia de TxB₂ en pacientes con nódulos pulmonares y en reservorios animales con infección crónica, demostrado en el estudio anterior (Morchón et al., 2006; Morchón et al., 2007d). Esta vasodilatación provocada al inicio de la destrucción parasitaria podría estar también mediada por el NO (Ferrara et al., 2003), puesto que DiSA también estimula la expresión de los enzimas necesarios para su producción (eNOS e iNOS).

Previamente, los productos excretados por los vermes adultos de *D. immitis* han sido implicados en el cambio de comportamiento de las células endoteliales, en relación con la alteración de la relajación de la pared vascular que ocurre durante el desarrollo de



la patología crónica, con la participación del NO y de los productos de una ciclooxigenasa no especificados (Kaiser et al., 1989; Mupanomunda et al., 1997). Nuestros resultados demuestran, por primera vez, que la patología aguda asociada a la muerte parasitaria en la dirofilariosis estaría mediada, durante la destrucción del parásito, por PGE₂, LTB₄ y NO. indicando, además, que moléculas similares están involucradas en la patología aguda, e identifican a la PGE₂ como el producto de la ciclooxigenasa que participa en el proceso.

La PGE₂ ha sido recientemente relacionada con el descenso de la permeabilidad a dextrano en células endoteliales vasculares de pulmón, lo que sugiere un efecto protector contra agresores que producen disfunción de la barrera vascular *in vitro* (Birukova et al., 2007). Nuestros datos concuerdan con estas observaciones, mostrando un descenso significativo de la permeabilidad a FITC-dextrano entre las 12 y 24 horas posteriores al inicio del estímulo con DiSA. Consecuentemente, el incremento de la expresión de PGE₂ podría ser responsable de esta disminución de la permeabilidad celular, al menos durante la primera fase del estímulo. En consonancia con este hecho, hemos comprobado que la estimulación de las células endoteliales con DiSA más un inhibidor de COX-2 restituye los niveles de permeabilidad obtenidos en los cultivos control. Datos obtenidos en el estudio previo de los eicosanoides en hospedadores naturales (gatos, en este caso) (Morchón et al., 2007d), sugieren una regulación de los eicosanoides dependiente del tiempo de la infección, mostrando también altas concentraciones sanguíneas de PGE₂ sólo durante las primeras fases de la infección, concentraciones que después se moderan o desaparecen, en el caso de la dirofilariosis humana. Encontramos, por tanto, que el proceso inflamatorio producido por la destrucción parasitaria no estaría acompañado, en un primer momento, por un aumento de la permeabilidad celular. Sin embargo, al desaparecer la PGE₂, la permeabilidad del endotelio podría aumentar, lo que sería compatible con la presencia de edema perivascular en la dirofilariosis cardiopulmonar en fases más avanzadas de la enfermedad (Morchón et al., 2007d). A este aumento de la permeabilidad podrían contribuir, además, otros factores, aparte de la ausencia o presencia de PGE₂.

Como ya hemos mencionado, el antígeno DiSA también produce aumento de la expresión de la 5-LO y del LTB₄, eicosanoide especialmente relacionado con la activación y reclutamiento de leucocitos (Sala & Folco, 2001), fenómeno que también

se observa en personas con dirofilariosis pulmonar (Morchón et al., 2006) y en gatos con dirofilariosis cardiopulmonar (Morchón et al., 2007d). Ambas son condiciones clínicas caracterizadas por una fuerte respuesta inflamatoria en las arterias pulmonares. Durante la inflamación, los leucocitos atraídos hacia el foco inflamatorio, se adhieren y migran a través de las paredes de los vasos sanguíneos, interaccionando con moléculas de adhesión presentes en las células endoteliales. La molécula de adhesión de las células vasculares-1 (VCAM-1), la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) y la molécula de adhesión plaquetaria al endotelio (PECAM-1), selectinas y otras (Yadav et al., 2003; Imhoff & Aurrand-Lions, 2004; Cook-Mills & Deem, 2005; Braunersreuther & March, 2006; Dejana, 2006), son algunas de las que intervienen en este proceso. Además, la PECAM-1 está relacionada, especialmente, con la transmigración de neutrófilos y monocitos (Imhoff & Aurrand-Lions, 2004; Braunersreuther & March, 2006), células clave en el desarrollo de la respuesta inflamatoria contra las filarias (Brattig et al., 2000). En el contexto general del proceso inflamatorio, el incremento de LTB_4 podría preceder al aumento de la expresión de ICAM-1 y PECAM-1, lo cual es consistente con nuestras observaciones en las células endoteliales tratadas con DiSA. Todos estos datos indican que el antígeno DiSA participa en la activación de las reacciones inflamatorias, ya que estimula la producción de LTB_4 y la expresión de moléculas de adhesión relacionadas con la migración a través de la pared vascular. Otros parásitos tales como *Trypanosoma brucei gambiense*, *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium* y *Schistosoma mansoni* estimulan también moléculas de adhesión en las células endoteliales (Ockenhouse et al., 1992; Oswald et al., 1994; Turner, 1997; Huang et al., 1999; Girard et al., 2005). La presencia de *Trypanosoma brucei gambiense* incrementa la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en cultivos de células endoteliales, lo que tiene como consecuencias, la potenciación de la reacción inflamatoria, el reclutamiento de leucocitos, el paso de los tripanosomas al sistema nervioso central y la alteración de la barrera endotelial durante la tripanosomosis humana (Girard et al., 2005).

Es importante señalar que el aumento de ICAM-1 y PECAM-1, tras la estimulación con DiSA, no se acompaña con un cambio de la localización celular de estas moléculas, necesario para su función adherente, probablemente porque en 24 horas no haya dado tiempo a su redistribución hacia los lugares donde realizan su función.

Se ha demostrado que las bacterias simbiotes *Wolbachia* son un componente abundante y estable de los adultos y demás fases evolutivas de *D. immitis* (Bandi et al., 1998) y que participan en las reacciones inmunes e inflamatorias contra el parásito a nivel sanguíneo (Kramer et al., 2005; Morchón et al., 2007b y c). Por ello, quisimos determinar en qué medida *Wolbachia* interviene en la estimulación de las células endoteliales en la patología vascular. Para determinar el papel de los simbiotes en los mecanismos inflamatorios del endotelio vascular, hemos analizado los mismos parámetros expuestos anteriormente, en cultivos de células endoteliales vasculares tratadas con WSPr de *Wolbachia*.

Previamente, y puesto que hemos empleado la forma recombinante de la molécula dominante de la cubierta de la bacteria, expresada en *Escherichia coli*, comprobamos que dicha molécula no estaba contaminada con LPS del vector de expresión. Esta cuestión previa es importante, ya que el LPS es una molécula bacteriana que estimula las reacciones inflamatorias por lo que, descartando la contaminación por LPS, podemos atribuir los estímulos observados exclusivamente a la WSPr. De hecho, esta molécula puede tener efectos similares a los del LPS, ya que se ha demostrado que interacciona con el TLR2 y en menor medida con el TLR4, receptores a los que también se une el LPS (Brattig et al., 2004). Además, debemos tener en cuenta que *Wolbachia* carece del gen que codifica para LPS (Wu et al., 2004).

Al igual que ocurre en los cultivos tratados con DiSA, la WSPr induce modificaciones en las células endoteliales, durante la estimulación temprana (24 horas), sin producir citotoxicidad ni alteraciones de los procesos fisiológicos básicos de las mismas. El antígeno de *Wolbachia* incrementa la expresión de COX-2, pero no se observan variaciones significativas de la expresión de los eicosanoides PGE₂ y TxB₂, cuya síntesis es catalizada por esta enzima. Rodríguez-Barbero et al. (2006) observaron niveles máximos de PGE₂ a partir de las 48 horas de haberse iniciado el estímulo con TGF-β en un cultivo de células mesenquiales *in vitro*. Es posible que sea necesario prolongar más tiempo el tratamiento de las células endoteliales con WSPr para que estimule la producción de ambos eicosanoides o solamente de alguno de ellos.

Hay que destacar que la WSPr también estimula la expresión de 5-LO y LTB₄. Esto podría indicar que la producción de LTB₄, y por lo tanto los efectos que produce, sea estimulada exclusivamente por *Wolbachia*, aunque no se puede descartar cierto



efecto sumatorio de los antígenos del verme adulto de *D. immitis*. Al mismo tiempo, demuestran que la producción de PGE₂ es exclusivamente atribuible a los antígenos del propio parásito y no de su endosimbionte, o al menos no a la proteína mayoritaria de la pared de *Wolbachia*. Este eicosanoide estimula la quimiotaxis y la activación de los leucocitos (Sala & Folco, 2001), por lo que, al igual que DiSA, WSPr parece estar implicada directamente en el reclutamiento de células inflamatorias. Estos datos, obtenidos en un modelo experimental, concuerdan que otros obtenidos en humanos y gatos infectados naturalmente (Morchón et al., 2006; Morchón et al., 2007d).

El antígeno WSPr estimula también la expresión de moléculas de adhesión de las células endoteliales. Se ha detectado un aumento de la expresión de ICAM-1 y PECAM-1 como en los cultivos tratados con DiSA, pero WSPr estimula además, la expresión de VCAM-1 y E-cadherina. Como se ha señalado anteriormente, ICAM-1, VCAM-1 y PECAM-1 están implicadas en diferentes fases de la adhesión y migración leucocitaria a través de la pared endotelial (Matheny et al., 2000; Pober et al., 2001; Yadav et al., 2003). La VCAM-1 produce señales para la síntesis de productos derivados del metabolismo del O₂ (ROS) que intervienen en el debilitamiento de las uniones homofílicas de E-cadherina (Hordijk, 2006). Nuestros datos sugieren que el antígeno WSPr de *Wolbachia* participa en el estímulo de la producción de dichas moléculas, pudiendo llegar a facilitar la trans migración de los leucocitos a través del endotelio vascular tanto entre células contiguas como a través del citoplasma. Este fenómeno podría suceder también en la dirofilariosis pulmonar humana, ya que, datos obtenidos por nuestro grupo en individuos con dirofilariosis humana, muestran e la presencia de células inflamatorias alrededor y dentro de los vermes muertos, en los que hay grandes concentraciones de *Wolbachia* (Grandi et al., en prensa) El incremento de la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales es inducido no sólo por parásitos, como ya se ha discutido anteriormente, sino también por bacterias (Parekh & Edge, 1994; Volk & Kox, 2000; Keller et al., 2003; Bannerman & Goldblum, 2003), por lo que debe ser considerado como parte de la respuesta del hospedador a los agentes infecciosos en general. En el caso de las filarias que contienen *Wolbachia*, como *D. immitis*, es muy probable que exista un estímulo dual de las moléculas de adhesión, por parte tanto de los antígenos de *Wolbachia* como de los de *D. immitis*. Por otra parte, la estimulación de la E-cadherina en células endoteliales vasculares tratadas

con WSPr podría deberse a un efecto de retro-alimentación producido por la producción de ROS mediado por la VCAM-1, contribuyendo también posiblemente, y de forma indirecta, al efecto global de DiSA en la disminución de la permeabilidad celular, ya que la E-cadherina participa en interacciones homofílicas entre las células del endotelio, manteniendo su integridad (Imhoff & Aurrand-Lions, 2004).

Al igual que en los cultivos tratados con DiSA, en los tratados con WSPr no se ha observado ningún cambio de localización celular de ICAM-1, VCAM-1 y PECAM-1, lo que parece indicar que esta redistribución, en caso de que ocurriese, debe producirse después de las primeras 24 horas.

La WSPr estimula también la expresión de VEGF. Las funciones descritas para esta molécula en relación con la inflamación son diversas. Así, el VEGF está implicado en múltiples funciones como la vasculogénesis, angiogénesis, aumento de la permeabilidad del endotelio, trans migración de leucocitos en unión con la E-cadherina y estimulación de mecanismos de supervivencia de las células endoteliales (Neufeld et al., 1999; Gerber et al., 1998). VEGF y E-cadherina se pueden asociar físicamente, actuando como un *gatekeeper* (guardameta), moviéndose en la membrana para permitir el paso de los leucocitos y volviendo a su posición posteriormente. Por otra parte, la asociación entre VEGF y E-cadherina endotelial disminuye la proliferación celular, a la vez que incrementa la actividad anti-apoptótica (Carmeliet et al., 1999). Bazzocchi et al. (2007) han demostrado que la WSP inhibe la apoptosis de los neutrófilos humanos, lo que según estos autores podría constituir un mecanismo que contribuye a la prolongación de la reacción inflamatoria. No obstante, en nuestro sistema, ni la proliferación celular ni la apoptosis ni la necrosis sufren variaciones durante las primeras 24 horas de tratamiento, por lo que podrían existir mecanismos mediados por E-cadherina/VEGF tardíos (más de 24 horas tras el tratamiento), y el aumento de la PECAM-1, que podrían contribuir a la estabilidad del ciclo celular y la inhibición de la apoptosis en las células del endotelio, lo que contribuiría al mantenimiento del proceso inflamatorio. Es importante señalar que tanto el aumento de VEGF como de E-cadherina sólo se produce tras el tratamiento con WSPr, por lo que este efecto podría ser atribuido a *Wolbachia* y no a los antígenos del propio parásito. El hecho de no haber detectado esta estimulación tras el tratamiento con DiSA, podría atribuirse a una concentración insuficiente de WSP en extractos totales del parásito, mientras que dicha

concentración aumentaría considerablemente cuando las bacterias son expulsadas a la sangre al morir los vermes.

La WSPr estimula, así mismo, la expresión de eNOS e iNOS en las células endoteliales, al igual que ocurre con DiSA. Esto sugiere que el estímulo podría estar relacionado principalmente con *Wolbachia*, aunque no se pueden descartar efectos concomitantes de ciertas moléculas propias del parásito. Previamente, nosotros hemos observado que ratones BALB/c inmunizados con WSP, muestran una intensa expresión de iNOS tres días después de la inoculación, mientras que ese estímulo no se produce cuando se administran antígenos derivados de vermes adultos de *D. immitis* (Morchón et al., 2007b), lo cual concuerda con los resultados obtenidos aquí. El NO es producido por diversos tipos de células y posee múltiples funciones (Bruckdofer, 2005) lo que hace difícil determinar el/los mecanismos en los que participa realmente. Además del estudio señalado anteriormente, un incremento de NO ha sido observado en macrófagos estimulados con antígenos de diferentes especies de filarias que contienen *Wolbachia* (Brattig et al., 2001; Taylor et al., 2000; Tezuka et al., 2002; Andrade et al., 2005), mostrando la importancia de este mediador inflamatorio en las infecciones por filarias. Queremos señalar de nuevo que uno de los efectos principales del NO es la vasodilatación (Kaiser et al., 89, Mupanomunda et al., 1997). Es posible que el NO endotelial derivado de la actividad de las dos enzimas, produzca una dilatación arterial al inicio del estímulo producido por la destrucción parasitaria, tal como hemos sugerido anteriormente (Kaiser et al., 1989; Mupanomunda et al., 1997).

En resumen, el tratamiento de células endoteliales vasculares con DiSA y WSPr produce, desde una fase muy temprana de la estimulación, cambios en la expresión de moléculas y procesos relacionados con los mecanismos inflamatorios, sin alterar la fisiología básica de la célula. Esto demuestra, por primera vez, la influencia directa de las moléculas de *D. immitis* y de su endosimbionte *Wolbachia* sobre las células endoteliales del hospedador, en cuanto a la estimulación de la producción de mediadores celulares implicados en procesos inflamatorios. Así mismo, abre el camino para posteriores estudios específicos para determinar la contribución de cada uno de ellos al conjunto del proceso inflamatorio estimulado por *D. immitis*.





1. En hospedadores animales y humanos con dirofilariosis crónica se detectan en suero altos niveles de TxB_2 y LTB_4 , mientras que la PGE_2 aparece con niveles inferiores o está ausente.

2. En la dirofilariosis felina experimental, los niveles de los tres eicosanoides a los seis meses postinfección, época en la que ya han aparecido las macrofilarias, son similares a los observados en infecciones naturales crónicas.

3. La muerte temprana de las larvas inducida por un tratamiento con ivermectina, causa alteraciones en la producción de PGE_2 y LTB_4 pero no de TxB_2 , lo que podría estar relacionado con la disminución de la gravedad de las reacciones inflamatorias, una vez que las larvas son eliminadas.

4. Se pone a punto y se demuestra la utilidad de un sistema *in vitro* de cultivo de células endoteliales vasculares para el estudio de la influencia de *D. immitis* sobre los distintos mediadores celulares y moleculares, relacionados potencialmente con la patología inflamatoria producida por el parásito.

5. El extracto antigénico de adultos de *D. immitis* (DiSA) y la molécula mayoritaria de la cubierta de *Wolbachia* (WSPr) estimulan selectivamente la expresión de moléculas directamente relacionadas con el proceso inflamatorio en células endoteliales vasculares a las 24 horas de tratamiento, sin alterar los procesos fisiológicos básicos de dichas células.

6. El antígeno DiSA está relacionado con los procesos de vasodilatación y disminución de la permeabilidad vascular durante las primeras 24 horas de tratamiento, hechos que podrían facilitar la supervivencia del parásito y limitar temporalmente algunos daños en el hospedador.

7. La molécula mayoritaria de la cubierta de *Wolbachia* (WSPr) estimula la expresión de algunas moléculas de las células endoteliales vasculares, que también aparecen estimuladas por DiSA. Además, estimula la expresión de otras moléculas, no estimuladas por DiSA en nuestro modelo experimental, que están directamente relacionadas con los procesos de reclutamiento, adherencia y trans migración de las células inflamatorias.

UNIVERSITY OF SALAMANCA
FACULTY OF BIOLOGY



**DEPARTAMENT OF ANIMAL BIOLOGY, PARASITOLOGY, ECOLOGY,
EDAFOTOLOGY AND AGRICULTURAL CHEMISTRY**

DOCTORAL THESIS

(ABSTRACT)

**Cellular and molecular mechanisms of the heartworm
disease vascular pathology. The role of filariae and
the endosymbiont *Wolbachia* bacteriae.**

Rodrigo Morchón García

Salamanca, 2008.



1. Introduction.

Dirofilaria immitis is the causal agent of cardiopulmonary dirofilariosis. This is a serious and potentially fatal disease affecting both domestic and wild cats and dogs worldwide (Venco & Vezzoni, 2001). This parasite can also infect man, in which it causes pulmonary dirofilariosis characterized by the development of benign pulmonary nodules, whose radiological images images mimic lung cancer and other malignant causes of pulmonary nodules.

The prevalence of the heartworm disease in canine populations varies between 0.5 and 73%, depending on various factors. Prevalence in felines reaches around one third of the prevalence observed in dogs (Genchi et al., 2001). The prevalence of human dirofilariosis are difficult to determine. Human contact with the parasite is common in endemic areas (Simón et al., 2005) and published clinical cases are more numerous every day (Pampiglione et al., 2000), thus it is considered one of today's emergent parasite diseases (Kramer et al., 2007).

Similar to other filarial species, *D. immitis* has a symbiotic relationship with bacteriae of the *Wolbachia* (Rickettsiaceae) genus. This endosymbiont is found in all the evolutionary stages of the parasite, being especially abundant in the hypodermis of the larvae that develop in the vertebrate hosts (L₃ and L₄) and adults of both sexes, as well as in the reproductive organs of female worms (Fenn & Blaxter 2004; Lamb et al., 2004). They are necessary for the moult and embryogenesis of the filariae (Bandi et al., 2001). In addition, they stimulate immune and inflammatory responses in the host (Taylor et al., 2001; Simón et al., 2007).

D. immitis reaches a different developmental stage depending on the host harbouring the parasite. Thus, it fully develops in dogs (McCall, 2001), while cats are more resistant hosts, presenting low parasitic loads and no microfilaremia (Mc Call et al., 1994; Atkins et al., 1995). In humans, the parasite usually develops only till the pre-adult stage, this being responsible for the development of pulmonary nodules (Cordero et al., 1992; Orihel & Eberhard, 1998).

Cardipulmonary dirofilariosis is a chronic disease. The first pathological changes occur in the pulmonary arteries after the arrival of the worms. Secondary to these vascular changes the lung disease appears and only in the last stages involvement



of the right cardiac chambers takes place. Pathogenic mechanisms are very complex involving mechanic processes, the host's immune response against the adult worms or microfilariae and factors released by filarial parasites (Venco y Vezzoni, 2001; Mupanomunda et al., 1997). Moreover, besides the chronic pathway of the disease, sometimes acute thromboembolisms and endarteritis may occur, causing severe life threatening of the affected hosts (Venco, 2007). These appear when spontaneous or treatment-induced worm's death exacerbates inflammatory reactions at the level of pulmonary arteries, producing a massive release of antigenic products, included those of the endosymbiont *Wolbachia* bacteriae present in *D. immitis* (Kramer et al., 2006).

The endothelium represents a multifunctional organ with several activities vital for the vascular system. Under normal conditions, endothelial cells form a monolayer, which restricts the flow of luminal contents into surrounding tissue spaces. Endothelial barrier dysfunction occurs when agonist stimulation produces cellular contraction, disruption of cell-cell contacts, and subsequent intercellular gap formation. Endothelial cells are of particular significance in the development of inflammation, since endothelium controls such diverse processes as vascular tone, homeostasis, adhesion of platelets and leukocytes, and permeability through the vascular wall. Inflammation is regulated by eicosanoids, powerful mediators that induce and suppress inflammation as a part of the response to disturbances (Liu y Weller, 1992). Eicosanoid synthesis is mediated by cyclooxygenases (COXs) and lipoxygenases (LOs). Several cell types participate in the synthesis and release of eicosanoids, while many others represent the targets for eicosanoid action. The activity of COX-2 leads to the production of prostaglandins (PGs) and thromboxanes (TXs), whilst 5-LO is associated with the production of leukotrienes (LTs). Each of these molecules has different regulatory effects in the inflammatory process (Sal y Folco, 2001). On the other hand, leukocytes interact with endothelial cell adhesion molecules such as the vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), the intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), the platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1), selectins and others (Yadav et al., 2003; Cook-Mills y Deem, 2005).

The inflammatory reactions at endothelial level, the molecules implicated and their role in the pathogenic mechanisms have been poorly investigated during the heartworm disease. In fact, only the presence of some cytokines and inflammatory



mediators has been demonstrated in blood from naturally *D. immitis* infected hosts (Bazzocchi et al., 2003; Morchón et al., 2007; Morchón et al., 2007). Moreover, alteration of pulmonary artery endothelial cell behaviour in dogs with heartworm disease has been related to active factors released by live *D. immitis* adult worms (Kaiser et al., 1989; Mupanomunda et al., 1997). Nevertheless the mechanisms of the acute endarteritis caused by the spontaneous or treatment-induced worm's death has not been studied until now.

This Thesis includes the last studies carried out by us on the different aspects of the inflammatory pathology of heartworm disease, in both animal reservoirs and humans, with a main emphasis in the construction of a model based in the *in vitro* vascular endothelial cells culture. This model has allowed us to initiate studies on the cellular and molecular mechanisms of the alterations caused by different *D. immitis* and *Wolbachia* antigens on the vascular endothelial cells.

2. Objectives.

The specific objectives of the present work are:

1. To identify the presence and quantitative variation of eicosanoids in naturally and experimentally *D. immitis* infected hosts during the infection course.
2. To design an experimental model *-in vitro* vascular endothelial cell culture- to study the effects of *D. immitis* and *Wolbachia* during the inflammatory process.
3. To identify the molecular and cellular mechanisms of the vascular endothelium acute inflammation process under massive parasite and *Wolbachia* antigens release, which occurs after spontaneous or induced drug death of *D. immitis* adult worms.

3. Materials and methods.

3.1. Eicosanoid production in natural and experimentally *D. immitis* infected hosts.

3.1.1. Serum samples.

Serum samples from dogs, cats and humans infected with *D. immitis* were used:



a) Serum samples from dogs. We analyzed 52 dog sera, divided in the following groups:

- G_1 – 12 sera from dogs with naturally acquired *D. immitis* microfilaremic infections and positive serology to the Canine Heartworm Antigen Test Kit, IDEXX Laboratories, Inc. Maine USA.

- G_2 – 30 sera from dogs with naturally acquired amicrofilaremic infections, asymptomatic and with positive results to the Canine Heartworm Antigen Test Kit.

Both G_1 and G_2 sera showed a strong anti-WSP IgG response.

- G_3 – 10 sera from healthy dogs located in non-endemic areas and with negative results to the Canine Heartworm Antigen Test Kit, that were used as negative controls.

b) Serum samples from cats. We analyzed serum samples from 69 cats collected in routine veterinary consults, divided in the following groups:

- ◆ G_1 - 20 sera from naturally infected, symptomatic cats living in an heartworm endemic area, echocardiographic and/or antibody-ELISA positive to *D. immitis*.

- ◆ G_2 - 10 sera from *D. immitis* experimentally infected cats, positive to the antibody-ELISA test (see next section).

- ◆ G_3 - 9 sera from experimentally infected cats treated with ivermectin 30 days after the infection (see next section).

- ◆ G_4 - 20 sera from clinically healthy cats taken during routine visits to a veterinary clinic located in a *D. immitis* non-endemic area.

c) Human serum samples. We used serum samples from 80 subjects, divided in 3 groups:

- G_1 - 10 sera from patients diagnosed with human pulmonary dirofilariosis, courtesy of Dr. Patrick Lammie from Atlanta CDC, USA. These sera presented high levels of anti-WSP and anti-*D. immitis* specific IgGs.

- G_2 - 40 sera from asymptomatic individuals (without pulmonary nodules and other signs of disease) from dirofilariosis endemic areas in Austria, Italy and Spain, and with specific anti-*D. immitis* antibodies.



■ G₃ - 30 sera from healthy donors collected in non-endemic areas, with negative serology to *D. immitis* and *Wolbachia* antigens. These samples were used as negative control.

3.1.2. Cat experimental infections and quimioprophylaxis.

Serum samples from cats of group G₂ were taken before infection and 60, 120 and 180 days post-infection (p.i.). In group G₃, ivermectin was administered 1 month after infection at 24 µg/kg (Cardotek FXTM, Merial) and serum samples were taken before infection, 15 days post-treatment (p.t.) (45 days p.i.), 90 days p.t. (120 days p.i.), 135 days p.t. (165 days p.i.) and 165 days p.t. (195 days p.i.).

3.1.3. Eicosanoid detection tests.

We analyzed prostaglandin E₂ (PGE₂), thromboxane B₂ (TxB₂) and leukotriene B₄ (LTB₄) levels using specific commercial ELISAs (ELISA ParameterTM PGE₂ Assay, ELISA TxB₂ Immunoassay and ELISA LTB₄ Immunoassay, R&D Systems Minneapolis, MN, USA) following the manufacturer instructions, with some modifications. Sera were analyzed at 1:10, 1:100 and 1:2 dilutions for PGE₂, TxB₂ and LTB₄, respectively. Optical densities (O.D.s) were measured at 450 nm for PGE₂, and at 405 nm for TxB₂ and LTB₄. Intra and inter-assay precision (variation coefficient, CVs) ranged from 9.8 to 3.1%, and between 12.1 to 8.1 %, respectively, for PGE₂. For TxB₂ the CVs were 3.6–1.6% and from 7.7 to 6.2%, respectively, and for LTB₄, the CVs were 6.0–5.9 and 15.7–5.0%, respectively.

3.1.4. Statistical analysis.

Data were statistically analyzed using the *Kruskal-Wallis* multiple comparisons non-parametric test. To compare paired data we used the *Wilcoxon* test. A statistically significant difference was defined as a *p*-value of *p*<0.05 and *p*<0.01 for a confidence level of 95 and 99%, respectively.



3.2. Studies related with vascular endothelial cells.

3.2.1. Cell culture.

Human endothelial cells -HAAE-1- from a 20 years old individual's aorta were grown in Ham's F12k medium modified with L-glutamine 2 mM and 1.5 g/L of sodium bicarbonate, and supplemented with 50 U/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin, 0.1 mg/ml heparin, 0.03 mg/ml endothelial cell growth supplement (ECGS), and 10% fetal bovine serum (FBS). Plates were pre-coated with 0.1% pig gelatine. Cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere in the presence of 5% CO₂-95% air. The medium was restored every 2-3 days. For the experiments, we used the cells of passage 6.

3.2.2. Exposure of endothelial cells to specific antigens.

For our experiments, we elected the somatic antigenic complex from *D. immitis* adult worms (DiSA) and the recombinant dominant wall protein of *Wolbachia* (WSPr). DiSA was prepared following the protocol described by Tamashiro et al (1985), using adult worms collected from naturally infected dogs with the help of flexible forceps introduced through the dog jugular (Dr. L. Venco, Veterinary Clinic Citta di Pavia, Pavia, Italy). WSPr is the same molecule used by Bazzochi et al. (2007), purified and analyzed to prove the elimination of *E. coli* LPS. In addition, WSPr was inactivated at 95°C 10 minutes, to eliminate LPS effects on endothelial cells during our experiments.

Endothelial cells (10⁶ cells/plate) were plated on 100 mm culture plates and were grown for 4 days to obtain confluent cultures. Then, cells were treated with increasing concentrations of DiSA (0.1, 0.5, 1, 10, 50, 100 or 500 µg/ml) or WSPr (0.1, 0.5 or 1 µg/ml) during 24 hours. Optimal concentrations, defined as the minimum amount of antigen inducing a statistically significant expression of eNOS and COX-2 compared with the negative, non-stimulated control cells, was 1 µg/ml from both antigen preparations, and thus this concentration was elected for subsequent experiments. Non-stimulated cells were used as controls in the same conditions.

3.2.3. Culture media and cell lisates obtention.

The antigen treated and untreated (controls) cell cultures were placed in ice to decrease the cellular metabolism. Subsequently, the culture media were taken from the



plates and centrifuged at 300 g, 3 min at 4°C. The supernatant was preserved at -80°C until use. The endothelial cells, attached to the culture plates, were washed twice with sterile PBS at 4°C, and then a cellular lysis buffer was added. The cell lysate from each plate was collected in sterile eppendorfs and centrifuged at 15.000 g, 10 min at 4°C. Aliquots of the supernatant were stored at -80°C. The protein concentration of the cellular lysate was measured using the DC protein Assay kit, based on Lowry's method. The quantification was repeated three times.

3.2.4. Tests for eicosanoids analysis.

PGE₂, TxB₂ and LTB₄ concentrations in the endothelial cell culture media were measured using commercial kits (ELISA ParameterTM PGE₂ Assay, ELISA TxB₂ Immunoassay and ELISA LTB₄ Immunoassay) following the manufacturer's instructions (see section 3.1.3.).

3.2.5. Western Blot.

Protein samples obtained from lysated cells (10 mg) were separated by SDS-PAGE under reducing conditions and blotted onto polyvinylidene difluoride membranes. Membranes were blocked (BSA 3-4%) before incubation with the following primary antibodies: sheep anti-COX-2, anti-VEGF, anti-VCAM-1, anti-ICAM-1, anti-PECAM-1, rabbit anti-5-LO, anti-iNOS, rat anti-E-cadherin, all at 1:1,000 dilution, and rabbit anti-eNOS at 1:2,500 and anti- α -tubulin at 1:5,000 dilution. After incubation with HRP-conjugated anti-IgG secondary antibodies (1:10,000 anti-sheep antiserum, 1:15,000 anti-rat antiserum, 1:20,000 anti-rabbit antiserum), bands were visualized by a luminol-based detection system with *p*-iodophenol enhancement. The anti- α -tubulin antibody was used to confirm loading of comparable amounts of protein in each lane. Protein expression was quantified by densitometry using the Scion Image software.

3.2.6. Transendothelial exchange.

Endothelial cell permeability was determined by the exchange of FITC-dextran Mr 40,000 through an endothelial monolayer. In brief, 5×10^4 endothelial cells were seeded on Transwell-collagen porous membranes (3 μ m pore size and 0.33 cm² area)



and cultured for 12 hours to obtain a highly confluent culture. After 24 h of incubation with DiSA or WSPr, FITC-dextran Mr 40,000 (10 $\mu\text{mol/L}$) was added to the upper compartment. NS-398, at a final concentration of 1 $\mu\text{g/ml}$, was used as transendothelial exchange positive control in the incubation with DiSA. Samples from the lower compartment were taken at 0, $\frac{1}{2}$, 1, 2, 4, 6, 12, and 24 hours and the transferred dextran determined in a fluorimeter with 485 nm excitation wavelength and 538 nm emission wavelength. As a control, we used non-treated cell cultures.

3.2.7. Cytotoxicity assays.

The potential cytotoxicity of the employed antigens on the endothelial cells was studied using the *Toxilight BioAssay* Kit, following the manufacturer's instructions. This commercial kit quantitatively measures the release of adenylate kinase from damaged cells.

3.2.8. Proliferation assays.

Cell proliferation was analyzed calculating the cell number by crystal violet nuclei staining, Western Blot of PCNA, and cell cycle by flow cytometry.

a) *Viable cell count.* Human endothelial cells were plated at 10,000 cells/well on 24-well plates to determine the number of viable cells by crystal violet nuclei staining over 6 days. The absorbance of the samples was then measured at 595 nm and transformed in number of HMC with a curve that correlated absorbance and number of endothelial cells.

b) *PCNA expression.* PCNA expression was analyzed with the anti-PCNA antibody (1:1,000 dilution) by Western Blot (refer to section 3.2.5). The secondary anti-mouse antibody (marked with HRP) was employed at a 1:15,000 dilution.

c) *Cell cycle.* Cell cycle (percentage of cells in a culture in phase S+G₂M) was evaluated by flow cytometry in the Cytometry Service of the University of Salamanca.

3.2.9. Cell migration assays.

Vertical and horizontal wounds were done over the endothelial cell confluent cultures and 1 μg of DiSA or WSPr was added for 4 hours. The cells migration distance



covered during the wound healing was measured using an inverted phase contrast microscope. Afterwards, we subtracted the initial distance of the wound (0 hours) from the end-point distance (4 hours). The final result was the mean of all the points at which the migration distance was measured (at least 60).

3.2.10. Apoptosis and cellular necrosis assays.

Annexin-V-FITC (Annexin-V) and Propidium Iodide (IP) were used to discriminate apoptotic from necrotic cells with the Vibrant™ Apoptosis Assay Kit by flow cytometry at the Cytometry Service in the University of Salamanca. The results are presented as the mean \pm S.E.M. of three experiments performed in duplicate.

3.2.11. Statistical analysis.

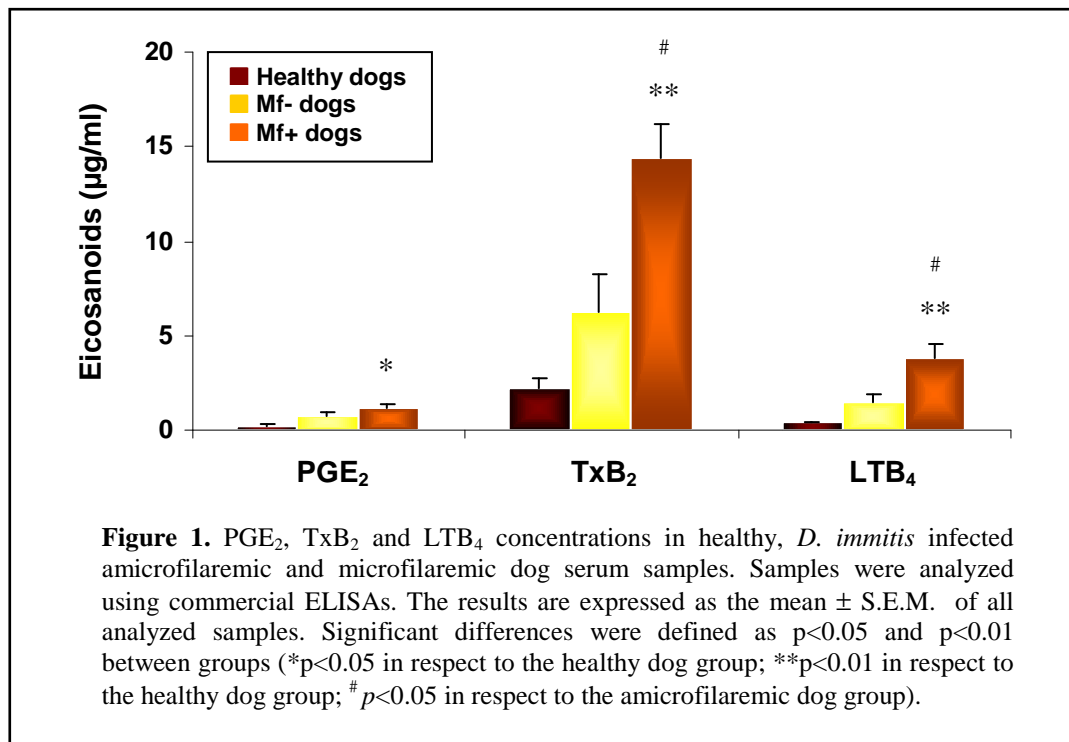
All assays except transendothelial exchange and proliferation were analyzed using the Student's *t*-test. Cell proliferation and Transendothelial exchange significance measurements (between-groups comparisons) were performed by ANOVA and corrected for repeated measurements when appropriate. If ANOVA revealed overall significant differences, individual means were evaluated post hoc using Bonferroni's procedure. All results were expressed as the mean \pm S.E.M. of at least three independent assays. In all experiments a significant difference was defined as a *p*-value of <0.05 and <0.01 , for a confidence level of 95% and 99% respectively.

4. Results.

4.1. Eicosanoids production in natural and experimentally *D. immitis* infected hosts.

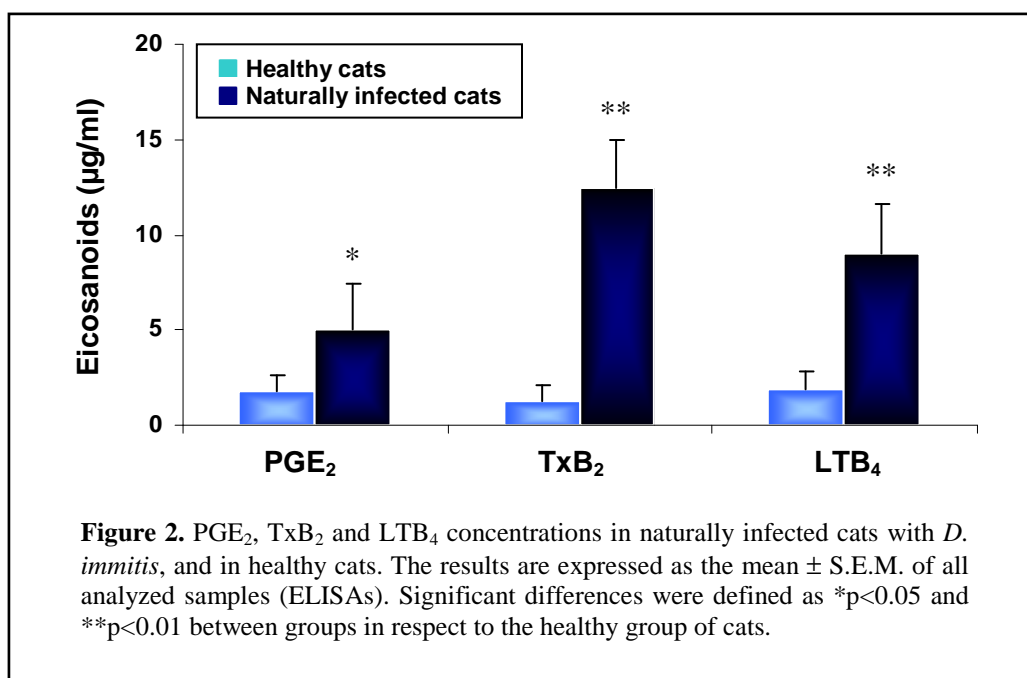
4.1.1. Eicosanoids in dogs.

Microfilaremic dogs presented significantly higher levels of TxB_2 than both dogs with occult infections ($p<0.05$) and healthy controls ($p<0.01$) (Figure 1). Furthermore, they showed significantly higher levels of LTB_4 than the other two groups ($p<0.05$ and 0.01 , respectively). PGE_2 levels were significantly higher in both infected groups when compared with the healthy controls ($p<0.05$).



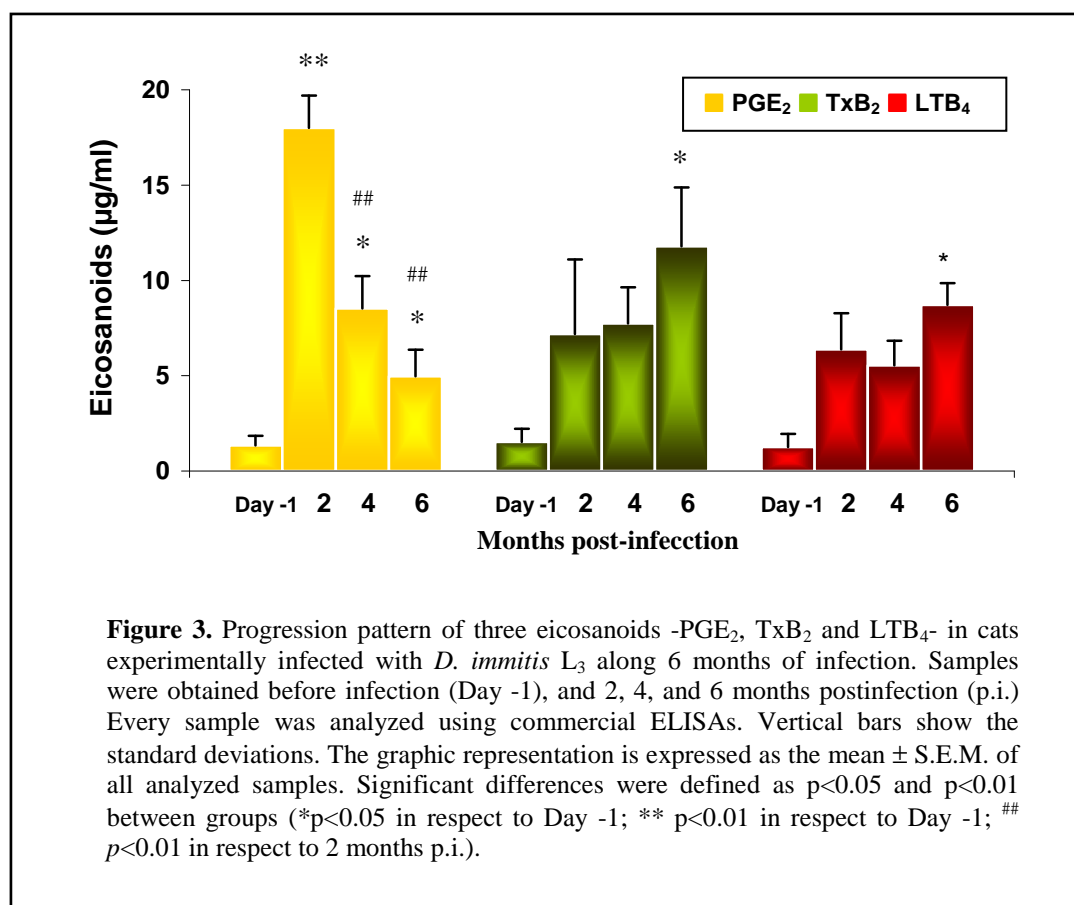
4.1.2. Eicosanoids in cats.

In naturally infected cats PGE₂, TxB₂ and LTB₄ values were significantly higher than in healthy cats (PGE₂ $p < 0.05$; TxB₂ and LTB₄ $p < 0.01$). TxB₂ was the eicosanoid with the highest level, followed by LTB₄ and PGE₂ (Figure 2).



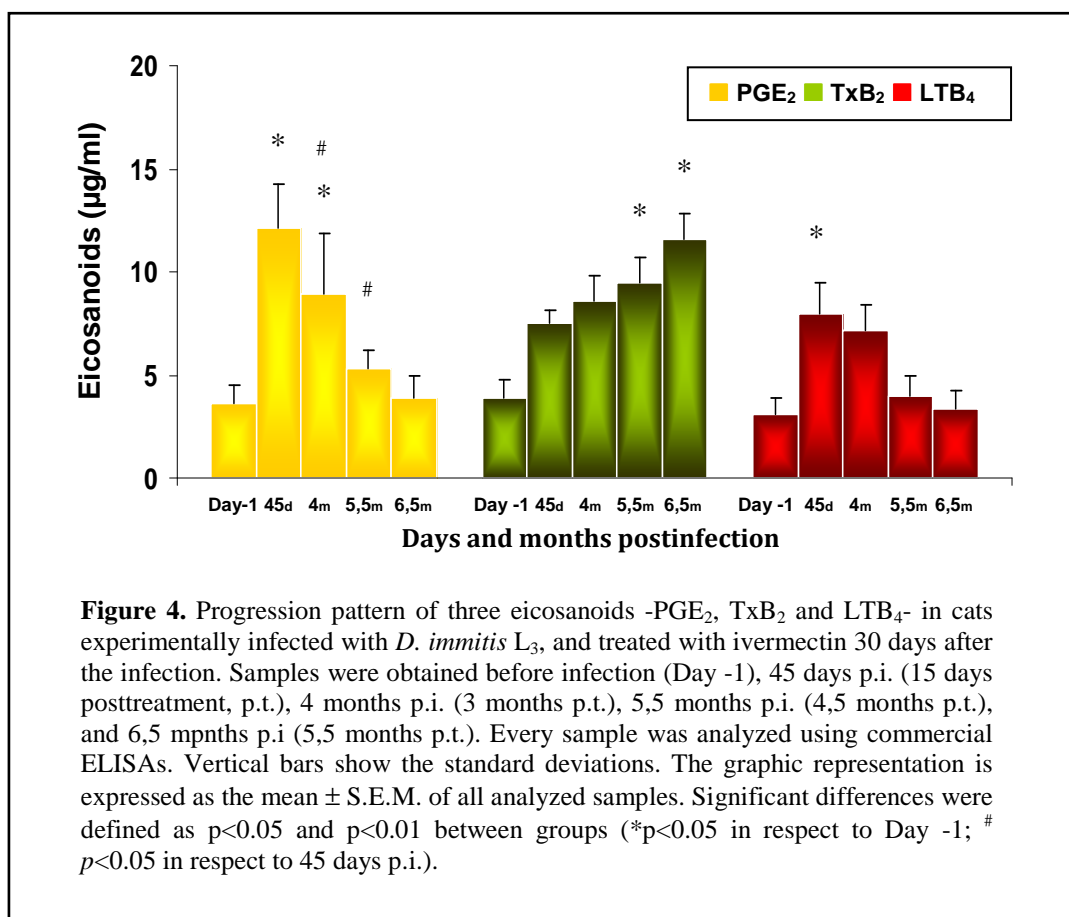


The progression of the PGE₂, TxB₂ and LTB₄ levels throughout the infection was studied in experimentally infected cats (Figure 3). PGE₂ showed a significant increase after infection, reaching its maximum at 60 days post-infection (p.i.). Afterwards, levels started to progressively decrease until the end of the study. There were significant differences between the values obtained before infection and after 60 (p<0.01), 120 (p<0.05), and 180 (p<0.05) days p.i. Also, we found significant differences between values obtained at 60 and 120 days p.i. (p<0.01), and between 60 and 180 days p.i. (p<0.01). There were no significant differences between the values obtained at 120 and 180 days p.i. TxB₂, along with LTB₄, gradually increased after infection with significantly higher values at 180 days p.i. compared to the values observed before infection (p<0.05). At 180 days p.i., the mean value for each eicosanoid was similar to the values obtained in naturally infected cats.





The effect of the *D. immitis* larvae's death in the production of PGE₂, TxB₂ and LTB₄ was studied in experimentally infected cats treated with ivermectin (Figure 4).



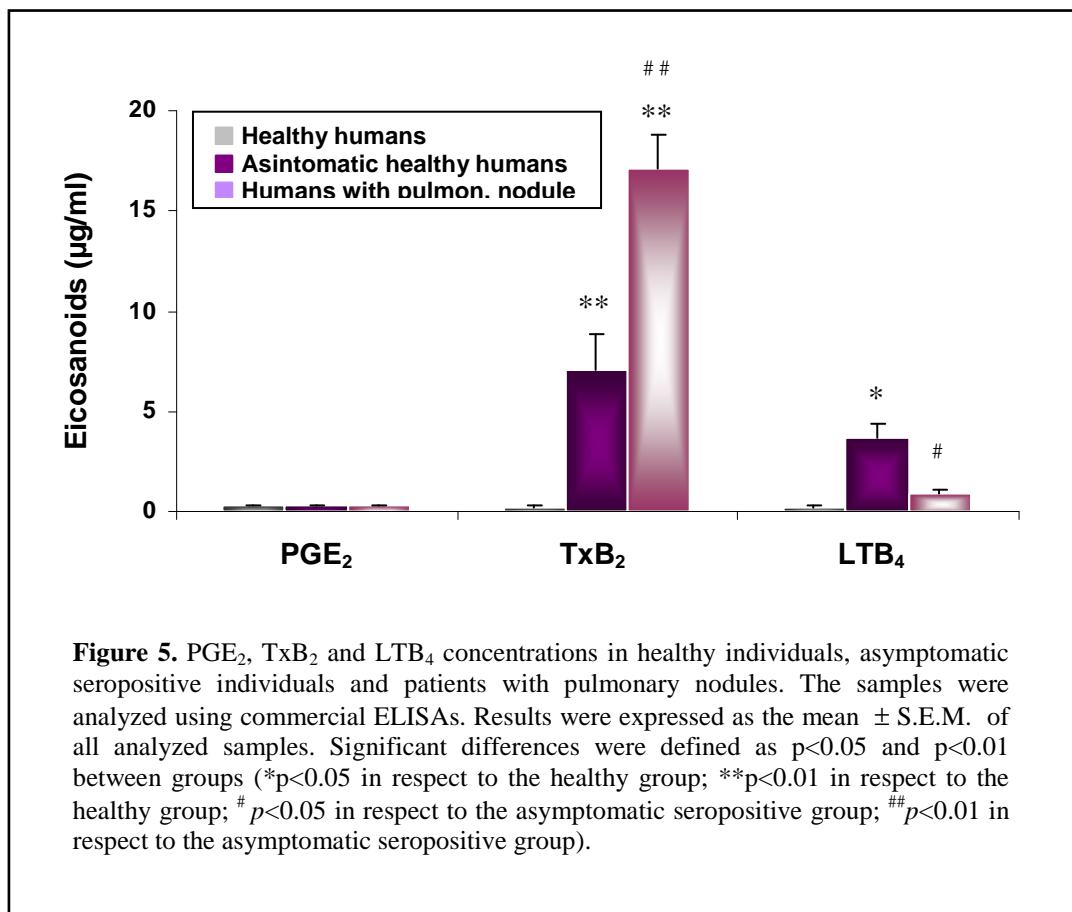
The progressive pattern of PGE₂ in the experimentally infected cats treated with ivermectin was similar to the pattern observed in the untreated infected cats, although overall values were lower in the former. PGE₂ reached its maximum at 45 days p.i. (15 days after treatment), and then decreased until the end of the study. We found significant differences between the values obtained before infection and 45 days p.i. (15 days after therapy), and also before infection and 3 months p.i. (90 days after therapy) ($p < 0.05$ for both cases). However, there were no significant differences between 45 days and 3 months p.i. In addition, PGE₂ levels observed during the final stage of the study (5,5 and 6,5 months p.i.), were significantly lower than those found 45 days p.i. ($p < 0.05$). There were no significant differences between PGE₂ levels before infection and



6,5 months p.i. TxB_2 levels gradually increased until 6,5 months p.i. ($p < 0.05$). We found differences in the progression patterns of LTB_4 from treated versus untreated cats. This eicosanoid increased at 45 days p.i. ($p < 0.05$), later slowly decreasing until 6,5 months p.i. There were no significant differences between values obtained before infection and those at 6,5 months p.i.

4.1.3. Eicosanoids in humans.

The TxB_2 levels were significantly higher in patients with pulmonary dirofilariosis than in the seropositive asymptomatic individuals from endemic areas and the healthy controls ($p < 0.01$ in both cases) (Figure 5). In addition, we found significant differences between the healthy seropositive individuals and the control group ($p < 0.01$). We only observed moderate levels of LTB_4 in the seropositive asymptomatic samples, and significantly different than those detected in the other two groups ($p < 0.05$). PGE_2 was not detected in any of the samples under study.





4.2. Development of an *in vitro* experimental culture model with vascular endothelial cells.

Following the indications of the commercial house ATCC-LGC Promochem, we created a HAAE-1 vascular human endothelial cell culture in which we analyzed the following data:

1. Time lapse needed to create a confluent cell monolayer on a plastic surface (petri dish).
2. Possibility of cell passage in order to expand the cell culture.
3. The oldest cell passage we could work with, trying to reach the best yield of the cell line to use it in subsequent experiments.
4. Cell number that must be grown in the selected passage and necessary time to reach confluence, depending on the size of the surface employed for each assay.

At the beginning of the culture, and after defrosting the cryopreserved HAAE-1 endothelial cells, these reached a confluent monolayer in approximately 7 days. Moreover, we observed that from that day on, cells died and detached from the petri dish.

Additionally, it was possible to do consecutive passages with the cells from dish to dish. During this process, we observed that between passage 1 and 6, cells took approximately 7 days to reach confluence. From passage 7 onward, the cell growth lengthened hence, and took more than 7 days to form a confluent monolayer. From passage 8 to passage 10, the cells took more than 10 days to reach confluence. Thus, we chose passage 6 as the best working passage day for this cell line.

Finally, we analyzed the number of endothelial cells that needed to be grown and the number of days needed to reach the confluence when using different plastic surfaces, depending on the assay to be done. We selected 24 well plates in which we grew 10,000, 30,000, 50,000 and 70,000 cells per well; 60 mm plates with 100,000, 300,000, 500,000 and 700,000 cells per well, and finally 100 mm plates with 1,000,000, 3,000,000, 5,000,000 and 7,000,000 cells per well. We elected to grow 50,000, 500,000 and 1,000,000 endothelial cells in 24 well plates and in petri dishes with diameters of 60

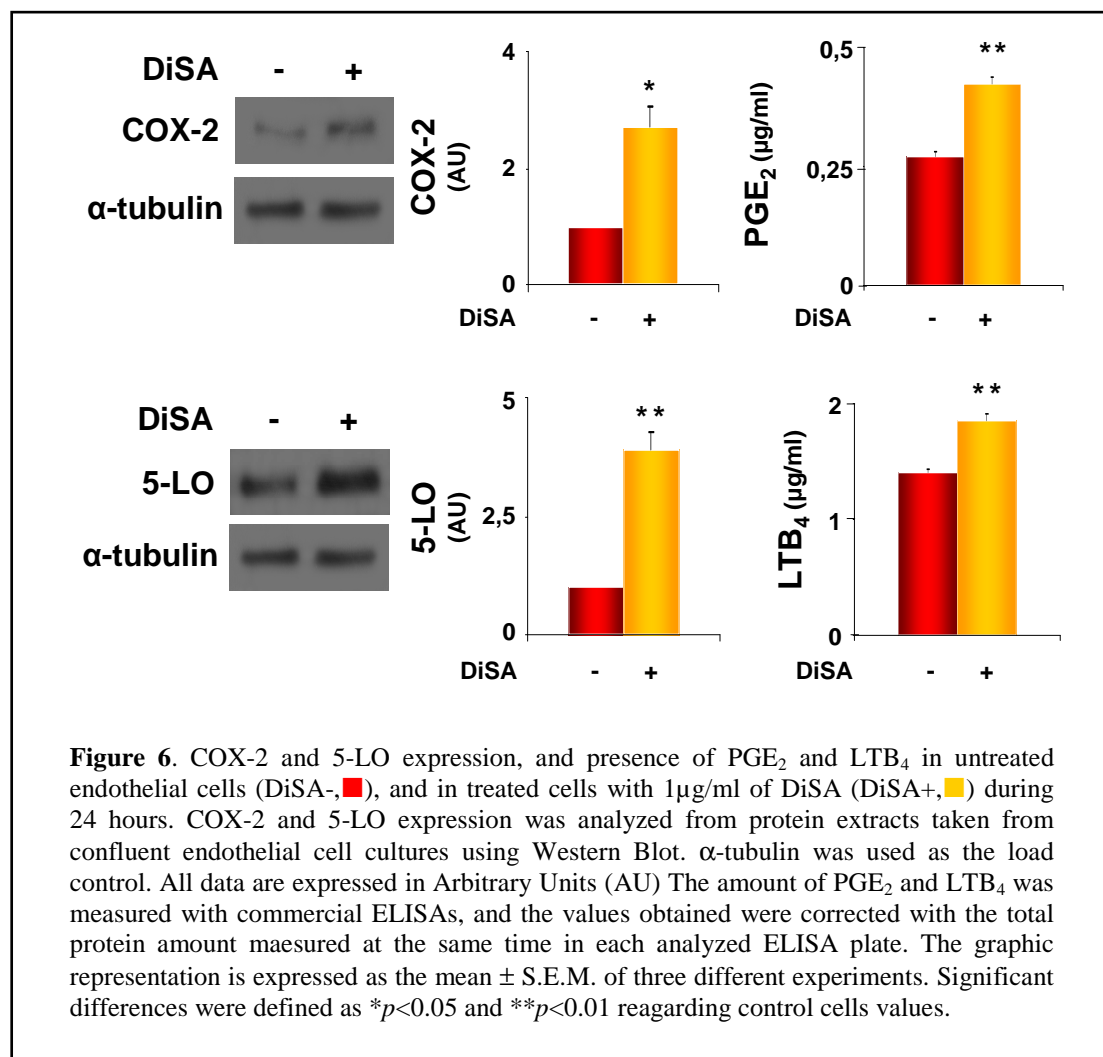


and 100 mm, respectively, with a 90% confluence time of 4 days, since these were the conditions that consistently presented similar results in the 3 above-mentioned surfaces.

4.3. *D. immitis* antigenic extract (DiSA) and recombinant *Wolbachia* surface protein (WSPr) effect on the inflammation related molecules in vascular endothelial cells.

4.3.1. DiSA and WSPr effect on COX-2 and 5-LO enzymes, and eicosanoids production.

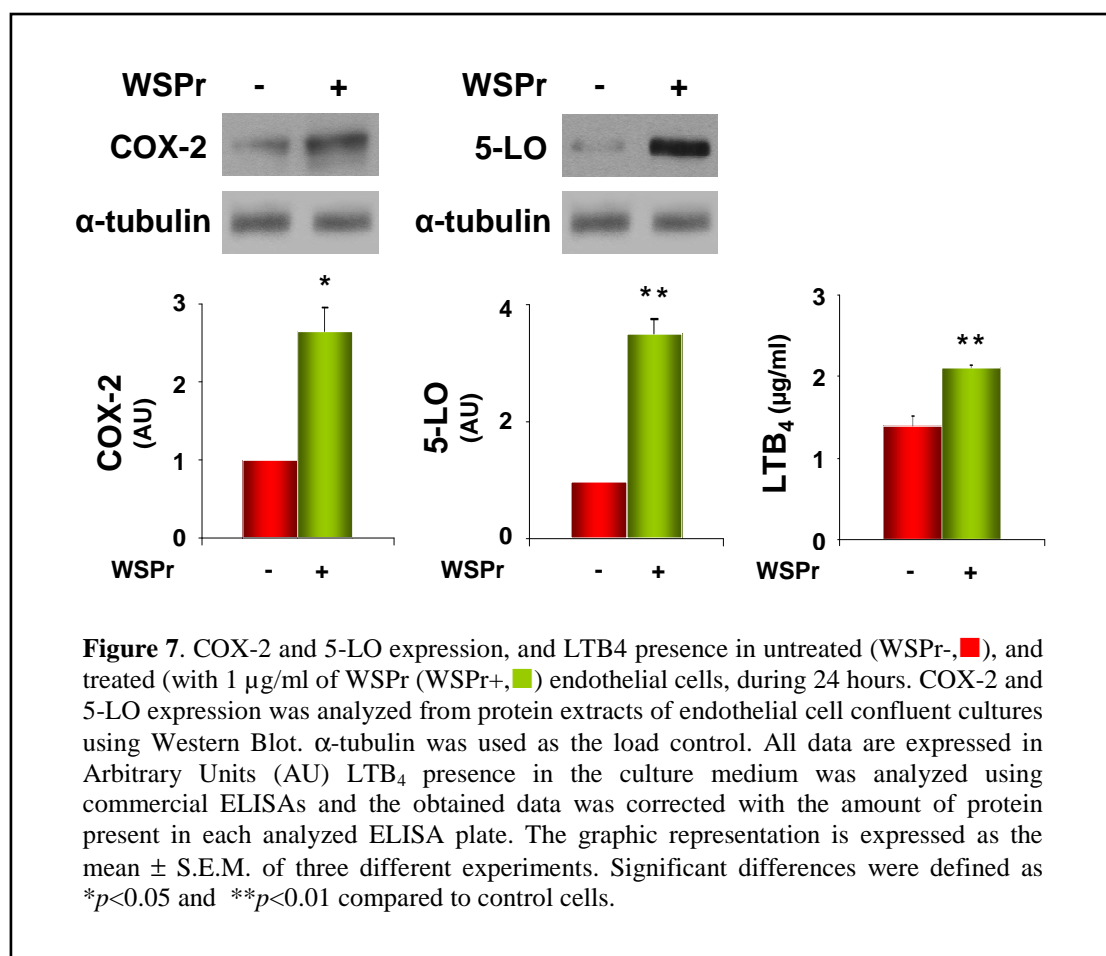
The effect of the antigenic extract from *D. immitis* adult worms (DiSA) and *Wolbachia* surface protein (WSPr) (Figure 6 y 7) over expression of COX-2 and 5-LO, enzymes associated with the arachidonic acid metabolism, was analyzed using W. blot.





Treatment with 1 $\mu\text{g/ml}$ of DiSA during 24 hours induced a significant increase in the expression of COX-2 ($p<0.05$), and 5-LO ($p<0.01$) compared to the untreated controls (Figure 6). To determine if arachidonic acid metabolism activation, through either COX-2 or 5-LO pathways, has direct consequences in the production of eicosanoids, we analyzed the presence of PGE_2 , TxB_2 and LTB_4 by ELISA in the DiSA-treated and untreated endothelial cell cultures. DiSA cell treatment caused a significant increase in the PGE_2 and LTB_4 production ($p<0.01$ in both cases), but did not change the TxB_2 levels.

Cultures treated with 1 $\mu\text{g/ml}$ of WSPr (Figure 7) showed a significant increase in the expression of COX-2 ($p<0.05$), and 5-LO ($p<0.01$), in comparison with their respective unstimulated controls. In addition, we observed a significant increase in the LTB_4 production from treated cells ($p<0.01$).

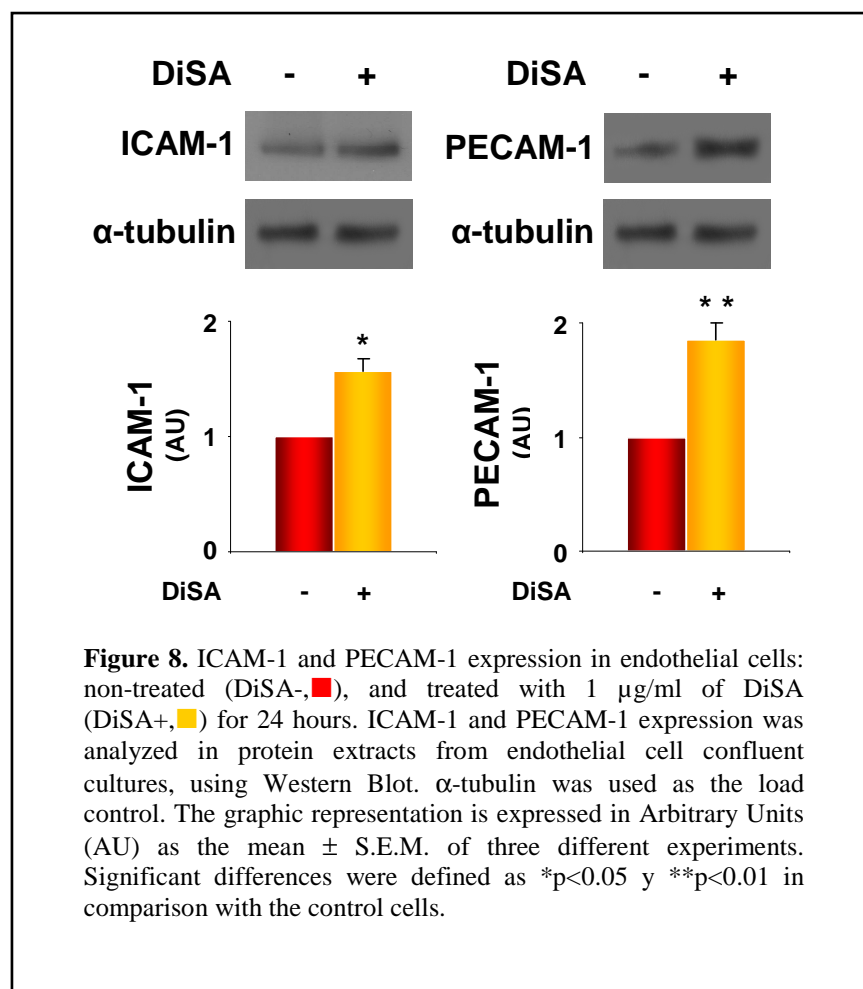


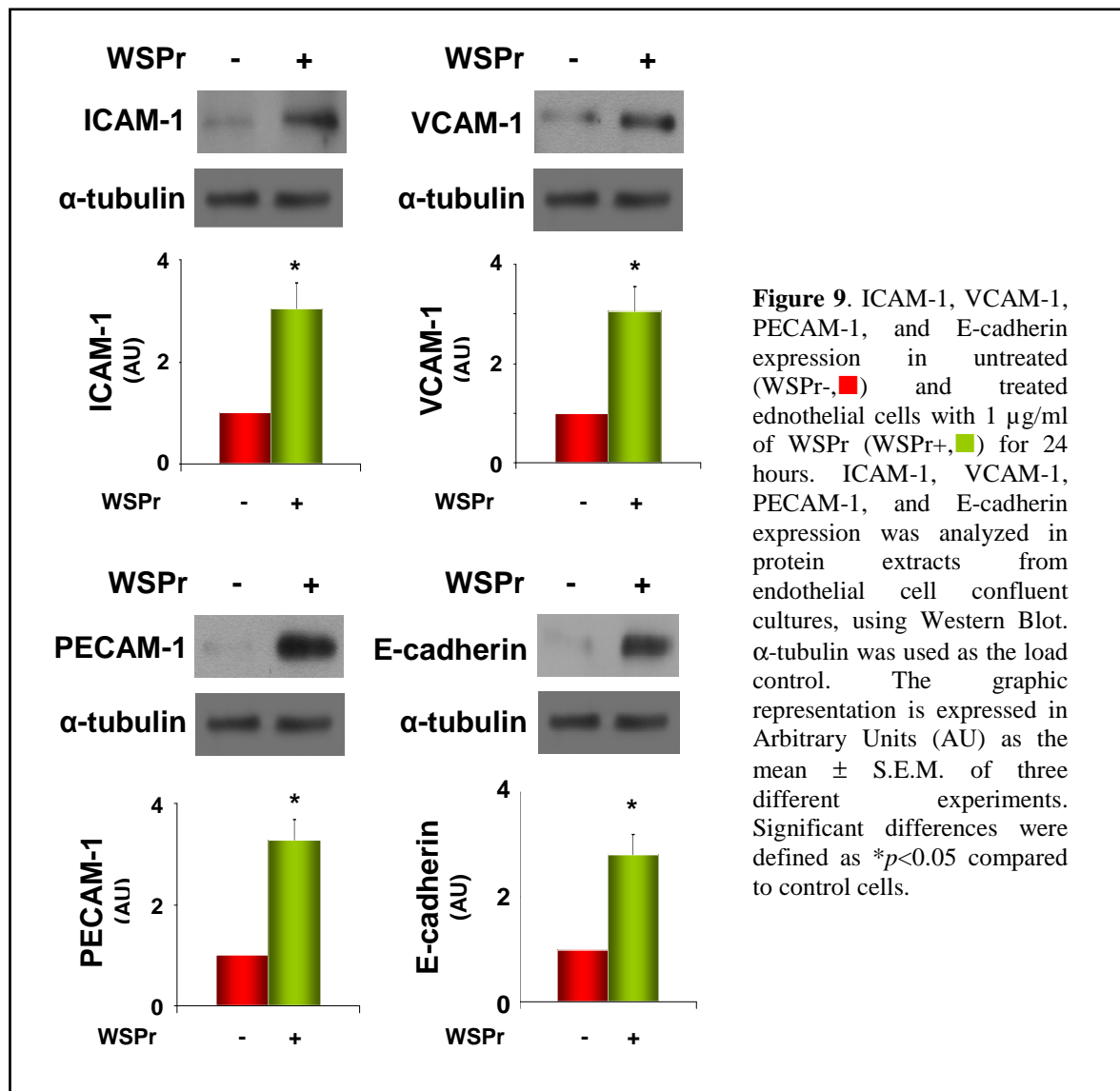


4.3.2. Effect of DiSA and WSPr on the expression of cell adhesion related molecules.

The effect of DiSA on the adhesion capacity from endothelial cells was analyzed measuring the expression of several cell membrane-associated molecules (VCAM-1, ICAM-1 and PECAM-1, related with adherence processes of leucocytes to the endothelium) and the E-cadherin, a molecule implicated in the hemophilic union between endothelial cells, by using Western Blot. Treatment with 1 μ g/ml of DiSA produced a significant increase in ICAM-1 ($p<0.05$) and PECAM-1 ($p<0.01$) (Figure 8).

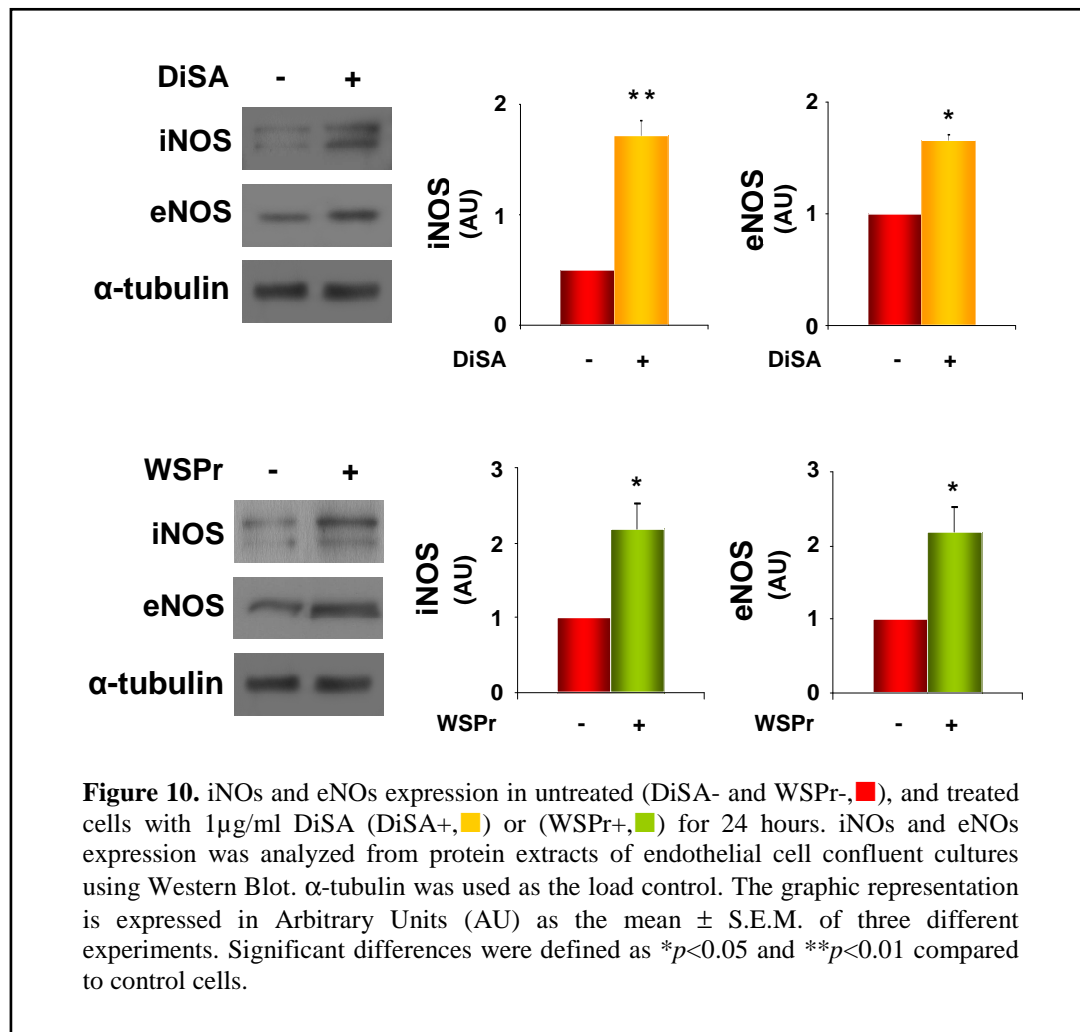
The treatment with 1 μ g/ml of WSPr produced a significant increase in the expression of VCAM-1, ICAM-1, PECAM-1 and E-cadherin ($p<0.05$), in comparison to the control cultures (Figure 9).





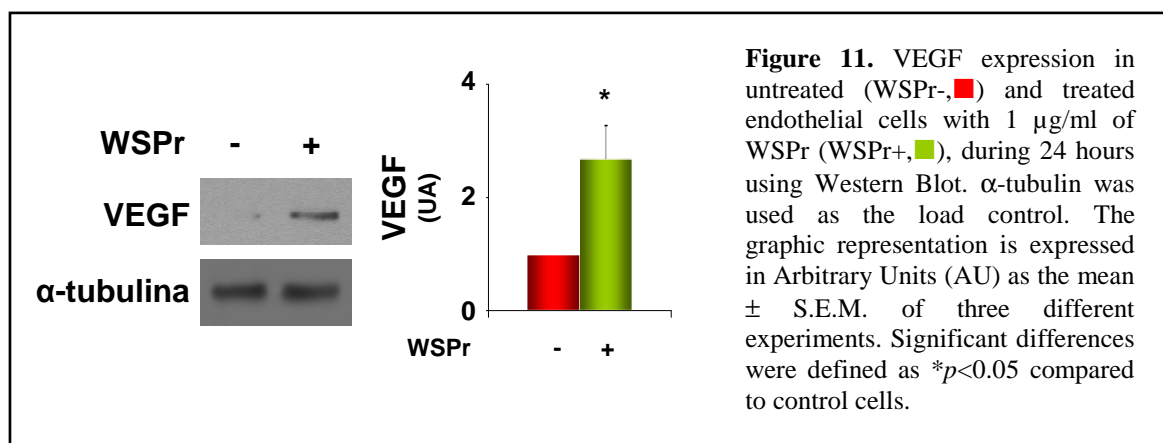
4.3.3. Effect of DiSA and WSPr on the expression of iNOs and eNOs, enzymes responsible for NO synthesis.

Cells treated with DiSA antigen (1 μ g/ml) for 24 hours produced a significant increase in the expression of both enzymes in comparison with that observed in non-treated cells. The iNOs increase was higher ($p < 0.01$) than eNOs ($p < 0.05$). The WSPr antigen (1 μ g/ml) produced a significant increase in the iNOs and eNOs levels ($p < 0.05$ for both) when compared to unstimulated cells (Figure 10).



4.3.4. Effect of DiSA and WSPr on the expression of VEGF.

Only WSPr (1μg/ml) caused significant differences in the expression of VEGF of treated cells (Figure 11).





4.3.5. DiSA and WSPr effect on endothelial permeability to molecules.

To determine the effect of DiSA and WSPr over endothelial permeability, we measured FITC-dextran flow through a confluent monolayer of endothelial cells.

Between 12 and 24 hours after cells treatment with DiSA (Figure 12), we could find a significant decrease in permeability ($p < 0.05$ in both cases). This decrease was abolished when a COX-2 inhibitor (NS-398) was used in combination with DiSA.

WSPr ($1\mu\text{g/ml}$) had no effect on the permeability of the endothelial cell cultures.

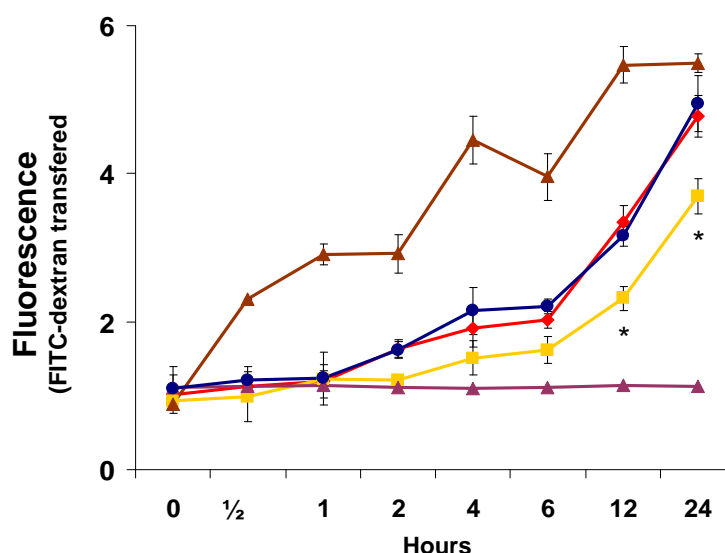


Figure 12. Endothelial permeability to molecules in untreated endothelial cells (♦), treated with $1\mu\text{g/ml}$ of DiSA (□), and treated with $1\mu\text{g/ml}$ of DiSA plus $1\mu\text{g/ml}$ of the COX-2 inhibitor NS-398 (●) for 24 hours. The permeability was quantified measuring the amount of FITC-dextran transferred through an endothelial cell monolayer. The fluorescence produced by FITC-dextran (▲), and by the culture medium (△) were used as positive and negative controls, respectively. The graphic representation is expressed in Arbitrary Units (AU) as the mean \pm S.E.M. of three different experiments in emitted fluorescence units. Significant differences were defined as $*p < 0.05$ compared to control cells.



4.3.6. DiSA and WSPr citotoxicity and effect on the proliferation, migration, apoptosis and necrosis of cells, and on cell cycle.

DiSA and WSPr (1µg/ml in both cases) produced no toxic effect on the treated cell cultures. The endothelial cell proliferation in treated cultures was studied using three different methods: (1) evaluation of the number of viable cells during a period of 10 days, (2) analysis of the expression of the nuclear cell proliferation antigen (PCNA) and (3) analysis of the cell cycle using flow cytometry. There were no differences in the number of viable cells prepared for mitosis (S+G₂M phases) between the untreated and treated cultures. We could not detect an apoptotic effect caused by DiSA. Similarly, the LPS-treated -1 and 10 µg/ml (control)- cells showed an increase in cellular necrosis but not an increased apoptosis, and thus no increase in the viable cell number prepared for mitosis (S+G₂M phases) was observed after LPS treatment. Finally, DiSA and WSPr had no effect in the migration of cells.

WSPr treatment of cells (1µg/ml) had no effect on toxicity, endothelial proliferation, migration distance, number of viable and death cells or in apoptosis rate, compared to untreated cells. Here, we also found that treatment of cells with LPS triggered cellular necrosis but not apoptosis. Subsequently, no increase in the viable cell number for mitosis (S+G₂M phases) was observed.

5. Discussion.

Heartworm disease is important from the veterinary point of view. Moreover, human pulmonary dirofilariosis must be included in the differential diagnosis of pulmonary nodules. Most of the information on the mechanisms of the inflammatory reactions of the disease has been obtained by studies carried out at the blood level. Nevertheless, there exist few data related to some aspects of the inflammatory pathology, such as the eicosanoids production and the influence of different *D. immitis* and *Wolbachia* antigens on the vascular endothelium, despite this is the tissue that directly interacts with the worms and their molecules.

Eicosanoids play a key role in the regulation of the immune and inflammatory processes in mammals. Their presence has been shown in limphatic filariosis (Liu & Weller, 1992; Liu et al.; 1992), and in oncocercosis (Brattig et al.; 2006). Here, we



show for the first time that *D. immitis* stimulates eicosanoid production in both human and animal hosts. Specifically, we found out that chronic dirofilariosis in humans, dogs and cats, when typical inflammatory phenomena are manifested, is predominantly accompanied by the TxB₂ eicosanoid. This is responsible for vasoconstriction, platelet aggregation and stimulation of Th₁ type pro-inflammatory responses. LTB₄, which stimulates leukocyte chemotaxis, was also detected in the three above-mentioned hosts. In addition, PGE₂ triggering vasodilation and Th₂-type responses, was found at very low levels in infected cats and dogs, and only during the first stage of infection as demonstrated by experimental infections in cats. PGE₂ was not detected in human hosts.

In canine dirofilariosis, we have detected PGE₂, TxB₂, and LTB₄, with higher levels in microfilaremic than in amicrofilaremic infections. We have previously demonstrated that microfilaremic individuals show a more intense cytokine expression and antibody response (Th₁ and Th₂) against *D. immitis* and *Wolbachia* antigens, than amicrofilaremic individuals (Kramer et al., 2005; Morchón et al., 2007c). It is known that circulating microfilariae are naturally dying in a turnover cycle, and thus continuously releasing *Wolbachia* into the bloodstream. This continuous stimulus could trigger higher levels of TxB₂, among others, in microfilaremic dogs, compared with amicrofilaremic dogs.

This is the first time that eicosanoids are observed in cats with heartworm disease. Thus there are no similar studies in the literature. In naturally infected cats the situation is similar to that described in infected dogs. The study carried out in experimentally infected cats demonstrates the existence of eicosanoids regulation during the development of the disease. Up to 60 days p.i., PGE₂ predominates. This eicosanoid has been related to mechanisms that facilitate the survival of filariae parasites -*Brugia* and *Onchocerca*- and its production has been attributed to the parasite itself (Liu et al., 1992; Brattig et al., 2006). At the end of the study (180 days p.i.), TxB₂ and LTB₄ showed higher levels than PGE₂ and they were similar to those observed in cats with natural chronic infections. The increase of TxB₂ and LTB₄ levels could be due to the development of inflammatory reactions characteristics of the chronic stage of the disease.

Larval death, induced by the treatment with ivermectin, is associated to the modification in the PGE₂ and LTB₄ production, while TxB₂ is not altered. If, as



indicated above, the high levels of PGE₂ are related to parasite survival mechanisms, the decrease of PGE₂ production is in agreement to the worms' death. On the other hand, the initial increase of LTB₄, days after the ivermectin dosage, could reflect the massive release of *Wolbachia* from the worms eliminated by the drug. In fact, it has been demonstrated that *Wolbachia* stimulates chemotaxis of neutrophils (Bazzocchi et al., 2003), one of the most important leukocytes implicated in the inflammatory reactions against filariae (Brattig et al., 2004). Moreover, as demonstrated in the next study, the *Wolbachia* surface protein (WSP) plays an important role in the stimulation of the LTB₄ expression by vascular endothelial cells. After, its level decrease, probably as a consequence of the clearance of *Wolbachia* antigens, and the disappearance of the stimulus.

The high levels of TxB₂ found in individuals with pulmonary dirofilariosis could correlate with the events that occur during the production of the pulmonary nodules. This is initially associated with arterial inflammation and obstruction, which could be guided by the vasoconstriction and platelet aggregation stimuli induced by TxB₂ (Davies et al., 1997). The presence of TxB₂ in dirofilariosis patients also matches with our previous studies showing the production of specific IgG₁ (Th₁-associated antibody) and a high number of inflammatory cells surrounding and inside the worms present in nodules in individuals with pulmonary dirofilariosis (Marcos-Atxutegi et al., 2004). It is worth mentioning that it has been described a substantial increase in the intravascular TxB₂ during septic shocks (Ball et al., 1986). Thus, the production of this eicosanoid in human dirofilariosis could be associated with the release of *Wolbachia* bacteria during the destruction of the worms, with subsequent nodules development.

The pathology of heartworm disease is very complex. Despite the development of a chronic foreseeable pathology is habitual, the simultaneous death of many worms exacerbates inflammatory reactions in the pulmonary arteries, causing acute thromboembolisms and endarteritis (Venco, 2007). This study shows that antigens from *D. immitis* adult worms (DiSA) and *Wolbachia* (rWSP) were not toxic for the endothelial cells and they neither induced necrosis or apoptosis also interfered in endothelial proliferation, indicating that the effects of these antigens on endothelial cell cultures are focused on inflammation-related phenomena.



Firstly, our data show that DiSA enhances the expression of COX-2, PGE₂, and the enzymes responsible for the synthesis of NO, eNOS and iNOS by endothelial cell after 24 hours of stimulation. COX-2 catalyzes the pathway of arachidonic acid to produce PGE₂. This eicosanoid is implicated in the regulation of vascular function, wound repair, inflammatory processes and lung injury (Betz y Fox, 1991; Birukova et al., 2007), while NO has been implicated in different mechanisms, including the autocrine regulation of the vascular pressure (Ferrara et al., 2003). Previously, the products excreted by *D. immitis* worms have been implicated in the change of the endothelial cells behaviour related to the altered relaxation of the vascular wall that occurs during the development of chronic pathology, with the involvement of NO and a cyclooxygenase product (Mupanomunda et al., 1997; Kaiser et al., 1989).

Moreover, our study shows a significant decrease in endothelial permeability to dextran between 12 and 24 h after stimulation with DiSA antigen. Because PGE₂ has been recently related to the decrease of dextran permeability in lung vascular endothelial cells (Birukova et al., 2007), we can hypothesize that the increase of PGE₂ expression observed in our system could contribute to diminish permeability of the endothelial cell cultures. Consistent with this, stimulation of endothelial cell cultures with DiSA plus an inhibitor of COX-2, enzyme responsible for the PGE₂ synthesis, clearly increases the endothelial permeability when compared to the results obtained by the stimulation with DiSA alone. The fact that stimulation with DiSA causes a decrease of the endothelial permeability seems contradictory with the development of perivascular oedema described in heartworm disease. Nevertheless, data obtained by us in *D. immitis*-experimentally infected cats suggest the existence of a time-regulation of the eicosanoids production, with high concentrations of blood PGE₂ only during the first time of the infection (Morchón et al., 2007). Moreover, the increase of PGE₂ production could be the responsible of the fact that no TxB₂ has been detected in our system, due to the cross regulation between these two eicosanoids (Sala y Folco, 2001).

DiSA also increases the expression of 5-LO and LTB₄, eicosanoid specifically related to activation and recruitment of neutrophils during the inflammatory process (Sala y Folco, 2001). We have previously demonstrated a significant increase of LTB₄ in humans with pulmonary dirofilariosis (Morchón et al., 2006) and in cats with cardiopulmonary dirofilariosis (Morchón et al., 2007). Both clinical conditions are



characterized by a strong inflammatory response in the pulmonary arteries. The increase in 5-LO expression and LTB₄ synthesis is in agreement with the increase of ICAM-1 and PECAM-1 adhesion molecules expression induced by DiSA in endothelial cells. ICAM-1 participates in the rolling and firm adhesion of leukocytes. Moreover, it has been related to the transcellular migration of leukocytes (Dejana, 2004). PECAM-1 is also involved in the transmigration of neutrophils and monocytes (Imhof y Aurrand-Loins, 2004), which are key cells in the development of the inflammatory response against filariae (O'Connor et al., 2000; Brattig et al., 2000). Taken together, these results suggest that DiSA participates in the stimulation of inflammatory reactions because it activates both leukocyte chemotaxis and adhesion molecules involved in their migration through the endothelial wall. Because the symbiotic bacteriae of the genus *Wolbachia* are present in the body of *D. immitis* (Bandi et al., 1998) and they participate in the immune and inflammatory response that infected hosts develops against *D. immitis* (Kramer et al., 2005; Morchón et al., 2007), probably molecules of *Wolbachia* could be involved in some of the stimuli observed here.

Similarly to DiSA, WSPr induces endothelial cell modifications related to the inflammatory process after 24 hours stimulation, without toxic effects or alterations in the basic physiologic cellular processes such as proliferation and apoptosis. This *Wolbachia* antigen increases COX-2 expression; however, there are no significant variations in PGE₂ or TxB₂ from treated cells, when compared with untreated controls. WSPr also stimulates the expression of 5-LO and LTB₄, which indicates that *Wolbachia* is partially or totally responsible for this stimulus, also observed when the endothelial cells are stimulated with DiSA. This is consistent with previous results from other authors showing the capacity of WSPr to activate neutrophils (Bazzocchi et al., 2003), and the concentration of leukocytes around worms' positive-oocytes and morules - parasite areas with a high concentration of *Wolbachia* previously observed in human dirofilariosis by us (Grandi et al., in press).

The WSPr antigen also causes an increase in the expression of the endothelial cell membrane adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, and PECAM-1. VCAM-1 participates in the migration of leukocytes through intercellular spaces, also transducting signals that stimulate the synthesis of products of O₂ metabolism (ROS). It is known that ROS causes a weakening of the homophilic unions of E-cadherin,



favoring the separation of contiguous endothelial cells, and facilitating the passage of leukocytes through the intercellular space (Hordijk, 2006). Finally, WSPr also stimulates the expression of VEGF and E-cadherin, as well as iNOS and eNOS, enzymes responsible for the synthesis of NO. Considering the variety of functions attributed to these molecules, we cannot identify their specific role in the period studied.

6. Conclusions.

1. High levels of TxB_2 and LTB_4 are detected in serum samples from both animal reservoirs and humans with chronic dirofilariosis, while levels of PGE_2 are lower in animals and absent in humans.

2. In the experimental feline dirofilariosis model, the levels of PGE_2 , TxB_2 and LTB_4 six months postinfection, with fully-developed adult worms, are similar to those observed in chronic natural infections.

3. The larvae early death induced by treatment with ivermectin causes a alteration in PGE_2 and LTB_4 levels but not in the level of TxB_2 . This could be related to the decrease of the severity of the inflammatory reactions, once the larvae are eliminated.

4. An *in vitro* culture system of vascular endothelial cells is developed, and its utility for the study of the influence of *D. immitis* on the different cellular and molecular mediators of these cells potentially related to the inflammatory pathology caused by the parasite is demonstrated.

5. The *D. immitis* antigenic extract (DiSA) and the *Wolbachia* recombinant surface protein (WSPr) selectively stimulate the expression of molecules directly related to the inflammatory process in vascular endothelial cells after 24 hours of treatment, without alterations of their basic fisiologic process.

6. The DiSA antigen is related to vasodilation and the decrease of vascular permeability during the first 24 hours of treatment. This could facilitate the survival of the parasite and transiently restrict early damages in the infected host.

7. WSPr also stimulates the expression from vascular endothelial cells of those molecules stimulated by DiSA. In addition, WSPr stimulates the expression of other vascular endothelial cell-derived molecules, related to leukocyte recruitment, cell adhesion and cell transmigration phenomena.





A

- Abou-Bacar A., Diallo M., Waller J., Cribier B., Candolfi E.** (2007). Human subcutaneous dirofilariosis due to *Dirofilaria repens*. A case diagnosed in Strasbourg, France. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, **100**: 269-270.
- Adams D. H., Shaw S.** (1994). Leucocyte-endothelial interactions and regulation of leucocyte migration. *Lancet*, **343**: 831-836.
- Ahid S. M., Lourenço de Oliveira R.** (1999). Mosquitoes potential vectors of canine heartworm in the Northeast Region from Brazil. *Revista de Saúde Pública*, **33**: 560-565.
- Allport J. R., Muller W. A., Luscinskas F. W.** (2000). Monocytes induce reversible focal changes in vascular endothelial cadherin complex during transendothelial migration under flow. *The Journal of Cell Biology*, **148**: 203-216.
- Alves L. C., de Almeida Silva L. V., Faustino M. A., McCall J. W., Supakonderj P., Labarthe N. W., Sánchez M., Caires O.** (1999). Survey of canine heartworm in the city of Recife, Pernambuco, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **94**: 587-590.
- Andrade M. A., Siles-Lucas M., Pérez Arellano J. L., Pou-Barreto C., Valladares B., Espinoza E., Muro A.** (2005). Increased rat alveolar macrophage expression of functional iNOS induced by a *Dirofilaria immitis* immunoglobulin superfamily protein. *Nitric Oxide*, **13**: 217-225.
- Aranda C., Octavi P., Eritja R., Castella J.** (1998). Canine filariasis. Importance and transmission in the Baix Llobregat area, Barcellona (Spain). *Veterinary Parasitology*, **77**: 267-275.
- Araujo A. M.** (1996). Canine and human *Dirofilaria immitis* infections in Portugal. A review. *Parassitologia*, **38**: 366.
- Araujo R. T., Marcondes C. B., Bastos L. C., Sartor D. C.** (2003). Canine dirofilariosis in the region of Conceição Lagoon, Florianópolis, and in the Military Police kennel, São José, State of Santa Catarina, Brazil. *Veterinary Parasitology*, **113**: 239-242.
- Arther R. G., Charles S., Ciszewski D. K., Davis W. L., Settji T. S.** (2005). Imidacloprid/moxidectin topical solution for the prevention of heartworm



- disease and the treatment and control of flea and intestinal nematodes of cats. *Veterinary Parasitology*, **133**: 219-225.
- Atkins C. E., Atwell R. B., Dillon R., Genchi C., Hayasaki M., Holmes R. A.** (1995). Guidelines for the diagnosis, treatment, and prevention of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in cats. En: Soll M. D., Knigh T. H. (Eds.). Proceedings o the Heartworm Symposium'95, *American Heartworm Society*, USA, pp: 309-312.
- Atkins C. E., Atwell R. B., Courtney C. H., Dillon R., Genchi C., Hagio M., Holmes R. A., Knight D. H., Lukof D. K., McCall J. W., Venco L.** (1998). Guidelines for the Diagnosis, Treatment and Prevention of Heartworm (*Dirofilaria immitis*) Infection in Cats. En: Seward R. L. (Ed.). Recent Advances in Heartworm Disease: Symposium '98, *American Heartworm Society*, USA, pp: 265-271.
- Auer H., Weinkarner M., Bstech A., Schnayder C., Dietze O., Kunit G., Aspöck H.** (1997). Ein seltener fall einer *Dirofilaria repens*-infestation des Nebenhodens. *Tropenmedizin und Parasitologie*, **19**: 53-58.
- Avdiukhina T. I., Postnova V. F., Abrosimova L. M., Kovtunov A. I., Arakel'ian S. E., Murashov N. E., Plenkina L. V., Grigor'eva E. S., Korotkov V. B., Petukhova G. A., Kurbatova L. I., Derbina Z. P., Dmitriev A. P., Korobov L. I., Loginov V. V., Grigor'ev G. A., Tarasov V. N., Savel'ev S. I., Sirotina E. P.** (2003). Dirofilariasis (*D. repens*) in the Russian Federation and some of the Commonwealth of Independent States countries: situation and trends. *Meditinskaja Parazitologija i Parazitarnye Bolezni*, **4**: 44-48.

B

- Badertscher R. R., Losonsky J. M., Paul A. J., Kneller S. K.** (1988). Two dimensional echocardiography for diagnosis of dirofilariasis in nine dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **7**: 843-846.
- Ball H. A., Cook J. A., Wise W. C., Halushka P. V.** (1986). Role of thromboxane, prostaglandins and leukotrienes in endotoxic and septic shock. *Intensive Care Medicine*, **12**: 116-126.



- Bandi C., Anderson T. J., Genchi C., Blaxter M. L.** (1998). Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. *Proceedings of the Royal Society B. Biological Sciences*, **265**: 2407-2413.
- Bandi C., Trees A. J., Bratting N. W.** (2001). *Wolbachia* in filarial nematodes: evolutionary aspects and implications for the pathogenesis and treatment of filarial diseases. *Veterinary Parasitology*, **98**: 215-238.
- Bannerman D. D. & Goldblum S. E.** (2003). Mechanisms of bacterial lipopolysaccharide-induced endothelial apoptosis. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, **284**: 899-914.
- Barriga O. O.** (1982). Dirofilariasis. En: Steele J. H., Schultz M. G. (Eds.), Handbook Series in Zoonoses, section C. Parasitic zoonoses, vol. II, *CRC Press Inc*, USA, pp: 93-110.
- Bazzocchi C., Cecilian F., McCall J. W., Ricci I., Genchi C., Bandi C.** (2000). Antigenic role of the endosymbionts of filarial nematodes: IgG response against the *Wolbachia* surface protein in cats infected with *Dirofilaria immitis*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B*, **267**: 1-6.
- Bazzocchi C., Comazzi S., Santoni R., Bandi C., Genchi C., Mortarino M.** (2007). *Wolbachia* surface protein (WSP) inhibits apoptosis in human neutrophils. *Parasite Immunology*, **29**: 73-79.
- Bazzocchi C., Genchi C., Paltrinieri S., Lecchi C., Mortarino M., Bandi C.** (2003) Immunological role of the endosymbionts of *Dirofilaria immitis*: the *Wolbachia* surface protein activates canine neutrophils with production of IL-8. *Veterinary Parasitology*, **117**: 73-83
- Beaufils J. P., Martin-Granel J., Bertrand F.** (1991). Présence de microfilaires de *Dirofilaria immitis* dans les urines d'un chat occlus. *Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie*, **26**: 467-472.
- Beall M. J., Chandrashekar R., Eberts M. D., Cyr K. E., Diniz P. P., Mainville C., Hegarty B. C., Crawford J. M., Breitschwerdt E. B.** (2008). Serological and molecular prevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Ehrlichia* Species in dogs from Minnesota. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, Feb 27 [Epub ahead of print]



- Belley A. & Chadee K.** (1995). Eicosanoid production by parasites: from pathogenesis to immunomodulation? *Parasitology Today*, **11**: 327-334.
- Betz M. & Fox B. S.** (1991). Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *Journal of Immunology*, **146**: 108-113.
- Bevilacqua M. P., Poher J. S., Mendrick D. L., Cotran R. S., Gimbrone M. A. Jr.** (1987). Identification an inducible endotelial-leukocyte adhesión molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **84**: 9238-9242.
- Bidgood A. & Collins G. H.** (1996). The prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs in Sydney. *Australian Veterinary Journal*, **73**: 103-104.
- Birukova A. A., Zagranichnaya T., Fu P., Alekseeva E., Chen W., Jacobson J. R., Birukov K. G.** (2007). Prostaglandins PGE2 and PGI2 promote endothelial barrier enhancement via PKA- and Epac1/Rap1-dependent Rac activation, *Experimental Cell Research*, **313**: 2504-2520.
- Biswas P., Canosa S., Schoenfeld D., Schoenfeld J., Li P., Cheas L. C., Zhang J., Cordova A., Sumpio B., Madri J. A.** (2006). PECAM-1 affects GSK-3beta-mediated beta-catenin phosphorylation and degradation. *The American Journal of Pathology*, **169**: 314-324.
- Bogatcheva N. V., Sergeeva M. G., Dudek S. M., Verin A. D.** (2005). Arachidonic acid cascade in endothelial pathobiology. *Microvascular Research*, **69**: 107-127.
- Bogdan C.** (2001). Nitric oxide and the inmune response. *Nature Immunology*, **2**: 907-916.
- Bouza S. & Dumenigo R.** (1985). Estudio preliminar de la influencia de las condiciones higienicas en las filarias caninas. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, **37**:19-21.
- Bowman D. D., Torre C. J., Mannella C.** (2007). Survey of 11 western states for heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection, heartworm diagnostic and prevention protocols, and fecal examination protocols for gastrointestinal parasites. *Veterinary Therapeutics*, **8**: 293-304.
- Bradley T. J., Sauerman D. M. Jr., Nayar J. K.** (1984). Early cellular responses in the Malpighian tubules of the mosquito *Aedes taeniorhynchus* to infection with *Dirofilaria immitis* (Nematoda). *The Journal of Parasitology*, **70**: 82-88.



- Brain S. D. & Grant A. D.** (2004). Vascular actions of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin. *Physiological Reviews*, **84**: 903-934.
- Brattig N. W., Lepping B., Timmann C., Büttner D. W., Marfo Y., Hamelmann C., Horstmann R. D.** (2002). *Onchocerca volvulus*-exposed persons fail to produce interferon-gamma in response to *O. volvulus* antigen but mount proliferative responses with interleukin-5 and IL-13 production that decrease with increasing microfilarial density. *The Journal of Infectious Diseases*, **185**: 1148-1154.
- Brattig N. W., Bazzocchi C., Kirsching C. J., Reiling N., Buttner D. W., Ceciliani F., Geisinger F., Hochrein H., Ernst M., Wagner H., Bandi C., Hoerauf A.** (2004). The major Surface protein of *Wolbachia* endosymbionts in filarial nematodes elicits immune response Through TLR2 and TLR4. *Journal of Immunology*, **73**: 437-445.
- Brattig N. W., Büttner D. W., Hoerauf A.** (2001). Neutrophil accumulation around *Onchocerca* worms and chemotaxis of neutrophils are dependent on *Wolbachia* endobacteria. *Microbes and Infection*, **3**: 439-446.
- Brattig N. W., Rathjens U., Ernst M., Geisinger F., Renz A., Tischendorf F. W.** (2000). Lipopolychacaride-like molecules derived from *Wolbachia* endobacteria of the filarial *Onchocerca volvulus* are candidate mediators in the sequence of inflammatory and antiinflammatory responses of human monocytes. *Microbes and Infection*, **2**: 1147-1157.
- Brattig N. W., Schwohl A., Rickert R., Büttner D. W.** (2006). The filarial parasite *Onchocerca volvulus* generates the lipid mediator prostaglandin E(2). *Microbes Infection*, **8**: 873-879.
- Braunersreuther V. & Mach F.** (2006). Leukocyte recruitment in atherosclerosis: Potencial targets for therapeutic approaches? *Cellular and Molecular Life Sciences*, **63**: 2079-2088.
- Bray M. A., Ford-Hutchinson A. W., Smith M. J.** (1981a). Leukotriene B4: an inflammatory mediator in vivo. *Prostaglandins*, **22**: 213-222.
- Bray M. A., Cunningham F. M., Ford-Hutchinson A. W., Smith M. J.** (1981b). Leukotriene B4: a mediator of vascular permeability. *British Journal of Pharmacology*, **72**: 483-486.



- Brglez J. & Senk L.** (1987). *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) Raillet et Henry, 1911, in dog. Zbornik Biotehniške Fakultete Univerze Edvarda Kardelja v Ljubljani, Veterinarstvo, **24**: 69–72.
- Bronstein A. M., Supryaga V. G., Stavrovsky B. I., Sabgaida T. P., Luchshev V. I., Korotkova G. I., Legonkov Y. A., Firsova R. A., Darchenkova N. N., Starkova T. V., Zhukova L. A., Bugrov A. N.** (2003). Human dirofilariasis in the Moscow Region. *Meditinskaja Parazitologija i Parazitarnye Bolezni*, **3**: 51-56.
- Bruckdorfer R.** (2005). The basic about nitric oxide. *Molecular Aspects of Medicine*, **26**: 3-31.
- Burns A. R., Smith C. W., Walker D. C.** (2003). Unique structural features that influence neutrophil emigration into the lung. *Physiological Reviews*, **83**: 309-336.
- Byeon K. H., Kim B. J., Kim S. M., Yu H. S., Jeong H. J., Ock M. S.** (2007). A serological survey of *Dirofilaria immitis* infection in pet dogs of Busan, Korea, and effects of chemoprophylaxis. *The Korean Journal of Parasitology*, **45**: 27-32.

C

- Calvert C. A., Rawlings C., McCal J. W.** (1994). Feline heartworm disease En: Sherding H.G. (Ed.), The cat Diseases and Clinical Management, *Churchill Livingstone Inc*, USA, pp: 623-645.
- Cancrini G. & Kramer L.** (2001). Insect vectors of *Dirofilaria* spp. En: Simón F., Genchi C. (Eds.), Heartworm infection in humans and animals, *Ediciones Universidad de Salamanca*, España, pp: 63-82.
- Cancrini G., Magi M., Gabrielli S., Arispici M., Tolari F., Dell'Omodarme M., Prati M. C.** (2006). Natural vectors of dirofilariasis in rural and urban areas of the Tuscan region, central Italy. *Journal of Medical Entomology*, **43**: 574-579.
- Cancrini G., Pietrobelli M., Frangipane di Regalbono A. F., Tampieri M. P., della Torre A.** (1995). Development of *Dirofilaria* and *Setaria* nematodes in *Aedes albopictus*. *Parassitologia*, **37**: 141-145.



- Carmeliet P., Lampugnani M. G., Moons L., Breviario F., Compernelle V., Bono F., Balconi G., Spagnuolo R., Oostuyse B., Dewerchin M., Zanetti A., Angellilo A., Mattot V., Nuyens D., Lutgens E., Clotman F., de Ruiter M. C., Gittenberger-de Groot A., Poelmann R., Lupu F., Herbert J. M., Collen D., Dejana E.** (1999). Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell*, **98**: 147-157.
- Carlos T. M. & Harlan J. M.** (1994). Leukocyte-Endothelial adhesion molecules. *Blood*, **84**: 2068-2101.
- Carlos R. S., Muniz Neta E. S., Spagnol F. H., Oliveira L. L., de Brito R. L., Albuquerque G. R., Almosny N. R.** (2007). Frequency of antibodies anti-*Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* and *Dirofilaria immitis* antigens in dogs from microrregion Ilhéus-Itabuna, State of Bahia, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, **16**: 117-120.
- Casiraghi M., Bandi C., Bazzocchi C., Anderson T., Genchi C.** (2001). A phylogenetic analysis of filarial nematodes: Comparison with the phylogeny of *Wolbachia* endosymbionts. *Parasitology*, **122**: 93-103.
- Clària J. & Romano M.** (2005). Pharmacological intervention of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase pathways. Impact on inflammation and cancer. *Current Pharmaceutical Design*, **11**: 3431-3447.
- Cook-Mills J. M. & Deem T. L.** (2005). Active participation of endothelial cells in inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, **77**: 487-495.
- Copland M. D., O'Callaghan M. G., Hajduk P., O'Donoghue P. J.** (1992). The occurrence of *Dirofilaria immitis* in dogs in South Australia. *Australian Veterinary Journal*, **69**: 31-32.
- Cordero, M., Muñoz, M. R., Muro, A., Simón F.** (1990). Transient solitary pulmonary nodule caused by *Dirofilaria immitis*. *European Respiratory Journal*, **3**: 1070-1071.
- Cordero M., Muñoz, M. R., Muro, A. A., Simón F., Perera M. L.** (1992a). Small calcified nodule: un undescribed radiologic manifestation of human pulmonary dirofilariasis. *Journal of Infectious Diseases*, **165**: 398-399.



- Cordero M., Muro A., Simón F., Tapia J. I., Espinoza E.** (1992b). Are transient pulmonary solitary nodules a common event in human dirofilariosis. *Clinical Investigador*, **70**: 437-444.
- Cringoli G., Rinaldi L., Veneziano V., Capelli G.** (2001). A prevalence survey and risk analysis of filariosis in dogs from the Mt. Vesuvius area of southern Italy. *Veterinary Parasitology*, **102**: 243-252.
- Crouch S., Kozlowski R., Slater K., Fletcher J.** (1993). The use of ATP Bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods*, **160**: 81-88.

CH

- Cha S. H., Park J. E., Kwak J. O., Kim H. W., Kim J. B., Lee K. Y., Cha Y. N.** (2005). Attenuation of extracellular acidic pH-induced cyclooxygenase-2 expression by nitric oxide. *Molecules and cells*, **19**: 232-238.
- Chavakis T., Keiper T., Matz-Westphal R., Hersemeyer K., Sachs U. J., Nawroth P. P., Preissner K. T., Santoso S.** (2004). The junctional adhesion molecule-C promotes neutrophil transendothelial migration in vitro and in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**: 55602-55608.
- Chiba R., Nakagawa N., Kurasawa K., Tanaka Y., Saito Y., Iwamoto I.** (1999). Ligation of CD31 (PECAM-1) on endothelial cells increases adhesive function of alphavbeta3 integrin and enhances beta1 integrin-mediated adhesion of eosinophils to endothelial cells. *Blood*, **94**: 1319-1329.
- Chothia C. & Jones E. Y.** (1997). The molecular structure of cell adhesion molecules. *Annual Review of Biochemistry*, **66**: 823-862.

D

- Davi G., Basili S., Vieri M., Cipollone F., Santarone S., Alessandri C., Gazzaniga P., Cordova C., Violi F.** (1997). Enhanced thromboxane biosynthesis in patients with chronic obstructive pulmonary disease. The Chronic Obstructive Bronchitis and Haemostasis Study Group. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **156**: 1794-1799.



- Deem T. L. & Cook-Mills J. M.** (2004). Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) activation of endothelial cell matrix metalloproteinases: role of reactive oxygen species. *Blood*, **104**: 2385-2393.
- Dejana E.** (2004). Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, **5**: 261-270.
- Dejana E.** (2006). The transcellular railway: insights into leukocyte diapedesis. *Nature Cell Biology*, **8**: 105-107.
- Deplazes P., Guscetti F., Wunderlin E., Bucklar H., Skaggs J., Wolff K.** (1995). Endoparasitenbefall bei Findel- und Verzicht-Hunden in der Sudschweiz. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, **137**: 172–179.
- Di Sacco B. & Vezzoni A.** (1992). Clinical classification of heartworm disease for the purpose of adding objectivity to the assessment of therapeutic efficacy of adulticidal drugs in the field. En: Soll M. D. (Ed.), Proceedings of the Heartworm Symposium '92, *American Heartworm Society*, USA, pp: 209-214.
- Dillon R., Brawner W. R., Hanrahan L.** (1995). Influence of number of parasites and exercise on the severity of heartworm disease in dogs. En: Soll M. D., Knight D. H. (Eds.), Proceedings of the Heartworm Symposium '95, *American Heartworm Society*, USA, pp: 113.
- Dimitrijevic S., Tasic A., Basic S., Adamovic V., Ilic T., Miladinovic-Tasic N.** (2007). Filariosis in dogs in Serbia. En: Genchi C., Ronaldi L., Cringoli G. (Eds.), *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat and human infections, *Rolando Editore*, Italia, pp: 201.
- Dorofeev L., Dashevskii V. V., Koltaniuk M. N., Sirotiuk N. P., Zhulaeva T. E.** (1997). Cases of dirofilariasis in inhabitants of the Crimea. *Meditinskaja Parazitologija i Parazitarnye Bolezni*, **4**: 7-8.
- Drysdale B. E., Zacharchuk C. M., Shin H. S.** (1983). Mechanism of macrophage-mediated cytotoxicity: production of a soluble cytotoxic factor. *Journal of Immunology*, **131**: 2362-2367.
- Duncan G. S. Andrew D. P., Takimoto H., Kaufman S. A., Yoshida H., Spellberg J., Luis de la Pompa J., Elia A., Wakeham A., Karan-Tamir B., Muller W. A., Senaldi G., Zukowski M. M., Mak T. W.** (1999). Genetic evidence for functional redundancy of Platelet/Endothelial cell adhesion molecule-1



(PECAM-1): CD31-deficient mice reveal PECAM-1-dependent and PECAM-1-independent functions. *Journal of Immunology*, **162**: 3022-3030.

Duran-Struuck R., Jost C., Hernandez A. H. (2005). *Dirofilaria immitis* prevalence in a canine population in the Samana Peninsula (Dominican Republic) - June 2001. *Veterinary Parasitology*, **133**: 323-327.

Dejana E., Spagnuolo R., Bazzoni G. (2001). Interendothelial junctions and their role in the control of angiogenesis, vascular permeability and leukocyte transmigration. *Thrombosis and Haemostasis*, **86**: 308-315.

E

Ebnet K., Suzuki A., Ohno S., Vestweber D. (2004). Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? *Journal of Cell Biology*, **117**: 19-29.

El-Awady M. K., Gad Y. Z., Wen Y., Eassawi M., Effat L., Amr K. S., Ismail S., Christ G. J. (2001). *Schistosoma hematobium* soluble egg antigens induce proliferation of urothelial and endothelial cells. *World Journal of Urology*, **19**: 263-266.

Elek G., Minik K., Pajor L., Parlagi G., Varga I., Vetési F., Zombori J. (2000). New human dirofilariosis in Hungary. *Pathology Oncology Research*, **6**: 141-145.

Engvall E., Jonsson K., Perlmann P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes. *Biochimica et Biophysica Acta*, **251**: 427-434.

Estran C., Marty P., Blanc V., Faure O., Leccia M. T., Pelloux H., Diebolt E., Ambrosetti D., Cardot-Leccia N. (2007). Human dirofilariasis: 3 cases in the south of France. *La Presse médicale*, **36**: 799-803.

Etienne-Manneville S., Manneville J. B., Adamson P., Wilbourn B., Greenwood J., Couraud P. O. (2000). ICAM-1-coupled cytoskeletal rearrangements and transendothelial lymphocyte migration involve intracellular calcium signaling in brain endothelial cell lines. *Journal of Immunology*, **165**: 3375-3383.

**F**

- Favia G., Lanfrancotti A., Della Torre A., Cancrini G., Coluzzi M.** (1996). Polymerase chain reaction-identification of *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria immitis*. *Parasitology*, **113**: 567-571.
- Fenn K. & Blaxter M.** (2004). Are filarial nematode *Wolbachia* obligate mutualist symbionts? *Trends in Ecology and Evolution*, **19**:163-166.
- Ferrara N. & Davis-Smyth T.** (1997). The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine Reviews*, **18**: 4-25.
- Ferrara N., Gerber H. P., LeCouter J.** (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine*, **9**: 669-676.
- Fitzgerland G. A.** (2003). COX-2 and beyond: approaches to prostaglandin inhibition in human disease. *Nature Reviews. Drug Discovery*, **2**: 879-890.
- Frank R. G., Mondesire R. R., Brandt K. S., Wisnewsky N.** (1998). Antibody of the *Dirofilaria immitis* aspartyl protease inhibitor homologue is a diagnostic marker for feline heartworm infections. *The Journal of Parasitology*, **84**: 1231-1236.
- Frank R. G., Wisnewsky N., Brandt K. S., Carter C. R., Jennings N. S., Selkirk M. E.** (1999). Molecular cloning of the 22-24 kDa excretory-secretory 22U protein of *Dirofilaria immitis* and other filarial nematode parasites. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **98**: 297-302.
- Fujinami F., Tanaka H., Ohshima S.** (1983). Prevalence of protozoans helminths among cats purchased for experimental use in the Kanto Area. *Jikken dobutsu. Experimental animals*, **32**: 133-137.
- Furlanello T., Caldin M., Vezzoni et al., A. Venco L. Kitagawa H.** (1998). Patogenesi. En: Genchi C., Venco L., Vezzoni A. (Eds.), La filariosi cardiopolmonare del cane e del gatto, *Editorial Scivac*, Italia, pp: 31-46.
- Fusco A. C., Salafsky B., Delbrook K.** (1986). *Schistosoma mansoni*: production of cercarial eicosanoids as correlates of penetration and transformation. *The Journal of Parasitology*, **72**: 397-404.



G

- Garnier J., Gibrat J. F., Robson B.** (1996). GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. *Methods in Enzymology*, **266**: 540-553.
- Gaudry M., Bregerie O., Andrieu V., El Benna J., Pocidalo M. A., Hakim J.** (1997). Intracellular pool of vascular endothelial growth factor in human neutrophils. *Blood*, **90**: 4153-4161.
- Geiger S. M. & Beelitz P.** (2003). Diagnosis of *Dirofilaria* species at the Institute for Comparative Tropical Medicine and Parasitology, Munich, Germany. En: Auer H., Hörweg C., Prosl H., Sattmann H (Eds.), *Helminthological Colloquium, Austrian Society of Tropical Medicine and Parasitology*, Austria, pp: 17.
- Genchi C., Guerrero J., McCall J. W., Venco L.** (2007). Epidemiology and prevention of *Dirofilaria* infections in dogs and cats. En: Genchi C., Rinaldi L., Cringoli G. (Eds.), *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat and human Infections, *Rinaldo Editore*, Italia, pp: 147-161.
- Genchi C., Kramer L. H., Prieto G.** (2001). Epidemiology of canine and feline dirofilariasis: a global view. En: Simón F., Genchi C. (Eds.), *Heartworm infection in humans and animals*, *Ediciones Universidad de Salamanca*, España, pp: 121-134.
- Genchi C., Rinaldi L., Cascone C., Mortarino M., Cringoli G.** (2005). Is heartworm disease really spreading in Europe? *Veterinary Parasitology*, **133**: 137-148.
- Genchi C., Venco L., Magnino S., Di Sacco B., Perera L., Bandi C., Pignatelli P., Formaggini L., Mazzucchelli M.** (1993). Aggiornamento epidemiologico sulla filariosi del cane e del gatto. *Veterinaria*, **7**: 5-14.
- Georgieva D., Kirkova Z., Ivanov A.** (2001). A study on the incidence and diagnostic of dirofilariosis (heartworm disease) in carnivores. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, **4**: 231-236.
- Gerber H. P., Dixit V., y Ferrara N.** (1998). Vascular Endothelial Growth Factor induces the expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, **273**: 13313-13316.



- Girard M., Giraud S., Courtioux B., Jauberteau-Marchan M. O., Bouteille B.** (2005). Endothelial cell activation in the presence of African trypanosomes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **139**: 41-49.
- Gough V. M., Kyriakides C., Hechtman H. B.** (2002). Molecular and cellular mediators of the inflammatory response (Critical care), *ACS Surgery: Principles and Practice*, **25**: 1-24.
- Grandi G., Morchon R., Kramer L.H., Kartashev V., Simon F.** (2008). *Wolbachia* in *Dirofilaria repens* causing human subcutaneous dirofilariosis. *Journal of Parasitology*. (En prensa).
- Grisham M. B., Granger D. N., Lefer D. J.** (1998). Modulation of leukocyte-endothelial interactions by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: relevance to ischemic heart disease. *Free Radical Biology & Medicine*, **25**: 404-433.
- Guillot P., Dachary D., Dallot M., Cadiergues M. C., Bain O.** (1998). Dirofilariose sous- cutanée à *Dirofilaria repens*. Un cas contracté en Gironde. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*, **125**: 105-107.
- Guerrero J., Ducos de la Hitte J., Genchi C., Rojo F., Gómez-Bautista M., Carvalho Valera M., Labarthe N., Bordini E., Gonzales G., Mancebo O., Patino F., Uribe L. F., Samano R.** (1992). Update on the distribution of *Dirofilaria immitis* in dogs from Southern Europe and Latin America. En: Soll M. D. (Ed.), Proceedings Heartworm Symposium '92, *American Heartworm Society*, USA, pp: 31-37.
- Guerrero J., McCall J. W., Genchi C.** (2002). The use of macrocyclic lactones in the control and prevention of heartworm and other parasites in dogs and cats. En: Vercruysse J., Rew R. S. (Eds.), *Macrocyclic lactones in antiparasitic therapy*, *CABI Publishing*, Reino Unido, pp: 353-369.
- Guerrero J., Ródenas A., Gutiérrez-Galindo J., Florit F.** (1995). The extension of the prevalence of *Dirofilaria immitis* in Cataluña, Spain. En: Soll M. D., Knight D. H. (Eds.), Proceedings of the Heartworm Symposium '95, *American Heartworm Society*, pp: 73-77.



H

- Hajilooi M., Sanati A., Ahmadih A., Ghofraniha A., Massoud A.** (2004). Circulating ICAM-1, VCAM-1, E-selectin, P-selectin, and TNFRII in patients with coronary artery disease. *Immunological Investigations*, **33**: 263-275.
- Haurand M. & Ullrich V.** (1985). Isolation and characterization of thromboxane synthase from human platelets as a cytochrome P-450 enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, **260**: 15059-15067.
- Henkle-Dührsen K., Eckelt V. H., Wildenburg G., Blaxter M., Walter R. D.** (1998). Gene structure, activity and localization of a catalase from intracellular bacteria in *Onchocerca volvulus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **96**: 69-81.
- Henao-Pérez J. & Montoya C. J.** (1999). Moléculas de adhesión: Bases fisiológicas y modelos fisiopatológicos para su estudio. *Revista de la Asociación Colombiana de Alergia, Asma e Inmunología*, **8**.
- Henry C. J. & Dillon R.** (1994). Heartworm Disease in Dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **204**: 1148-1151.
- Hoerauf A., Nissen-Pähle K., Schmetz C., Henkle-Duhrsen K., Blaxter M. L., Buttner D. W., Gallin M. Y., Al-Qaoud K. M., Lucius R., Fleischer B.** (1999). Tetracycline therapy targets intracellular bacteria in the filarial nematode *Litomosoides sigmodontis* and results in filarial infertility. *The Journal of Clinical Investigation*, **103**: 11-18.
- Hood J. D., Meininger C. J., Ziche M., Granger H. J.** (1998). VEGF upregulates ecNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. *American Journal of Physiology*, **274**: H1054–H1058.
- Hordijk P. L.** (2006). Endothelial signalling events during leukocyte transmigration. *Journal of Federation of American Societies for Experimental Biology*, **273**: 4408-4415.
- Huang H., Calderon T. M., Berman J. W., Braunstein V. L., Weiss L. M., Wittner M., Tanowitz H. B.** (1999). Infection of endothelial cells with *Trypanosoma cruzi* activates NF-kappaB and induces vascular adhesion molecule expression. *Infection and Immunity*, **67**: 5434-5440.



Huang M., Mason J. C., Birdsey G. M., Amsellem V., Gerwin N., Haskard D. O., Ridley A. J., Randi A. M. (2005). Endothelial intercellular adhesion molecule (ICAM)-2 regulates angiogenesis, *Blood*, **106**: 1636-1643.

I

Imhof B. A. & Aurrand-Lions M. (2004). Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nature reviews. Immunology*, **4**: 432-444.

Ishihara K., Sasaki Y., Kitagawa H. (1986). Development of a flexible alligator forceps: a new instrument for removal of heartworms in the pulmonary arteries of dogs. *Nippon Juigaku Zasshi*, **48**: 989-991.

Ishihara K., Kitagawa H., Sasaky Y. (1990). Efficacy of heartworm removal in dogs with dirofilariasis hemoglobinuria using Flexible Alligator Forceps. *Japanese Journal of Veterinary Science*, **53**: 591-599.

Imhof B. A. & Aurrand-Lions M., Jaitovich A. & Etcheverry G. J. (2004). Adhesion molecules. Their role in cardiovascular physiopathology. *Medicina (Buenos Aires)*, **64**: 455-462.

J

Jafari S., Gaur, S. N. S., Khaksar Z. (1995). Prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs of Fars province of Iran. *Journal of Applied Animal Research*, **9**: 27-31.

Jelinek T., Schulte-Hillen J., Loscher T. (1996). Human dirofilariasis. *International Journal of Dermatology*, **35**: 872-875.

Jensen J., Muller E., Dauschies A. (2003). Arthropod-borne diseases in Greece and their relevance for pet tourism. *Praktische Tierarzt*, **84**: 432-438.

Jerkic M., Rodríguez-Barbero A., Prieto M., Toporsian M., Pericacho M., Rivas-Elena J. V., Obreo J., Wang A., Pérez-Barriocanal F., Arévalo M., Bernabéu C., Letarte M., López-Novoa J. M. (2006). Reduced angiogenic responses in adult endoglin heterozygous mice. *Cardiovascular Research*. **69**: 845-854.



K

- Kaiser L., Mupanomunda M., Williams J. F.** (1996). *Brugia pahangi*-induced contractility of bovine mesenteric lymphatics studied in vitro: a role for filarial factors in the development of lymphedema? *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **54**: 386-390.
- Kaiser L., Spickard R. C., Sparks Jr. H. V., Williams J. F.** (1989). *Dirofilaria immitis*: Alteration of endothelium-dependent relaxation in the “in vivo” canine femoral artery. *Experimental Parasitology*, **69**: 9-15.
- Kaiser L., Tithof P. K., Lamb V. L., Williams J. F.** (1991). Depression of endothelium-dependent relaxation in aorta from rats with *Brugia pahangi* lymphatic filariasis. *Circulation Research*, **68**: 1703-1712.
- Kaiser L., Tithof P. K., Williams J. F.** (1990). Depression of endothelium-dependent relaxation by filarial parasite products. *The American Journal of Physiology*, **259**: 648-652.
- Kaiser L., Williams J. F., Meade E. A., Sparks H. V.** (1987). Altered endothelial cell-mediated arterial dilation in dogs with *D. immitis* infection. *The American Journal of Physiology*, **253**: 1325-1329.
- Kajita S., Ruebel K. H., Casey M. B., Nakamura N., Lloyd R. V.** (2005). Role of COX-2, thromboxane A2 synthase, and prostaglandin I2 synthase in papillary thyroid carcinoma growth. *Modern Pathology*, **18**: 221-227.
- Kawka D. W., Ouellet M., Héту P. O., Singer I. I., Riendeau D.** (2007). Double-label expression studies of prostacyclin synthase, thromboxane synthase and COX isoforms in normal aortic endothelium. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1771**: 45-54.
- Keiper T., Al-Fakhri N., Chavakis E., Athanasopoulos A. N., Isermann B., Herzog S., Saffrich R., Hersemeyer K., Bohle R. M., Haendeler J., Preissner K. T., Santoso S., Chavakis T.** (2005a). The role of junctional adhesion molecule-C (JAM-C) in oxidized LDL-mediated leukocyte recruitment. *Journal of Federation of American Societies for Experimental Biology*, **19**: 2078-2080.



- Keiper T., Santoso S., Nawroth P. P., Orlova V., Chavakis T.** (2005b). The role of junctional adhesion molecules in cell-cell interactions. *Histology and Histopathology*, **20**: 197-203.
- Keiser P. B., Reynolds S. M., Awadzi K., Ottesen E. A., Taylor M. J., Nutman T. B.** (2002). Bacterial endosymbionts of *Onchocerca volvulus* in the pathogenesis of posttreatment reactions. *The Journal of Infectious Diseases*, **185**: 805-811.
- Keller T. T., Mairuhu A. T., de Kruif M. D., Klein S. K., Gerdes V. E., ten Cate H., Brandjes D. P., Levi M., van Gorp E. C.** (2003). Infections and endothelial cells. *Cardiovascular Research*, **60**: 40-48.
- Kendall K., Collins G. H., Pope S. E.** (1991). *Dirofilaria immitis* in cats from inner Sydney. *Australian Veterinary Journal*, **68**: 356-357.
- Kim Y. H. & Huh S.** (2005). Prevalence of *Toxocara canis*, *Toxascaris leonina* and *Dirofilaria immitis* in dogs in Chuncheon, Korea (2004). *The Korean Journal of Parasitology*, **43**: 65-67.
- Kirkova Z., Ivanov A., Georgieva D.** (2007). Dirofilariosis in dogs and wild carnivores in Bulgaria. En: Genchi C., Ronaldi L., Cringoli G. (Eds.), *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat and human infections, *Rolando Editore*, Italia, pp: 204.
- Kishimoto T. K. & Rothlein R.** (1994). Integrins, ICAMs, and selectins: role and regulation of adhesion molecules in neutrophil recruitment to inflammatory sites. *Advances in Pharmacology*, **25**: 117-169.
- Kitagawa H., Sasaky Y., Ishiara K.** (1987). Canine dirofilaria hemoglobinuria: changes in right heart hemodynamics and heartworm migration from pulmonary artery toward right atrium following beta-blocker administration. *Nippon Juigaku Zasshi*, **49**: 1081-1086.
- Kitoh K., Watoh K., Chaya K., Kitagawa H., Sasaki Y.** (1994). Blood coagulopathy in dogs with shock induced by injection of heartworm extract. *American Journal of Veterinary Research*, **55**: 1542-1647.
- Klotins K. C., Martin S. W., Bonnett B. N., Peregrine A. S.** (2000). Canine heartworm testing in Canada: are we being effective? *The Canadian Veterinary Journal*, **41**: 929-937



- Knight D. H.** (1995). Guidelines for diagnosis and management of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection. En: Bonagura J. D. (Ed.), *Kirk's Current Veterinary Therapy XII, Small Animal Practice*, WB Saunders Co, USA, pp: 879-887.
- Knight D. H. & Lok J. B.** (1995). Seasonal timing of heartworm chemoprophylaxis in the United States. En: Soll M. D., Knight D. H. (Eds.). *Proceedings of the Heartworm Symposium '95, American Heartworm Society*, USA, pp: 37-42.
- Koopman G., Reutelingsperger C. P., Kuijten G. A., Keehnen R. M., Pals S. T., van Oers M. H.** (1994). Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, **84**: 1415-1420.
- Kotani T. & Powers K. G.** (1982). Developmental stages of *Dirofilaria immitis* in the dog. *American Journal of Veterinary Research*, **43**: 2199 - 2206.
- Kozek W. J.** (1977). Transovarially-transmitted intracellular microorganisms in adult and larval stages of *Brugia malayi*. *The Journal of Parasitology*, **63**: 992-1000.
- Kozek W. J. & Figueroa H. F.** (1977). Intracytoplasmatic bacteria on *Onchocerca volvulus*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **26**: 663-678.
- Kramer L. H., Tamarozzi F., Morchón R., López-Belmonte J., Marcos-Atxutegi C., Martín-Pacho R., Simón F.** (2005). Immune response to and tissue localization of the *Wolbachia* surface protein (WSP) in dogs with natural heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **106**: 303-308.
- Kramer L. H., Kartashev V. V., Grandi G., Morchón R., Nagornii S. A., Karanis P., Simón F.** (2007). Human subcutaneous dirofilariasis, Russia. *Emerging Infectious Diseases*, **13**: 150-152.
- Ku D. D., Zaleski J. K., Liu S., Brock T. A.** (1993). Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries. *American of Journal Physiology*, **265**: 586-592.
- Kucsera I., Szénási, Danko J.** (2007). Review of human dirofilariosis diagnosed at the Department of Parasitology, National Center of Epidemiology, Budapest,



Hungary. En: Genchi C., Ronaldi L., Cringoli G. (Eds.), *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat and human infections, *Rolando Editore*, Italia, pp: 197.

L

Labarthe N., Ferreira A. M., Guerrero J., Newcomb K., Paes-de-Almeida E. (1997). Survey of *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) in random source cats in metropolitan Rio de Janeiro, Brazil, with descriptions of lesions. *Veterinary Parasitology*, **71**: 301-306.

Labarthe N. & Guerrero J. (2005). Epidemiology of heartworm: what is happening in South America and Mexico? *Veterinary Parasitology*, **133**: 149-156.

Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**: 680-685.

Lai C. H., Tung K. C., Ooi H. K., Wang J. S. (2001). Susceptibility of mosquitoes in central Taiwan to natural infections of *Dirofilaria immitis*. *Medical and Veterinary Entomology*, **15**: 64-67.

Lamb V. L., Williams J. F., Kaiser L. (1993). Effect of serum from dogs infected with *Dirofilaria immitis* on endothelium-dependent relaxation of rat aorta *in vitro*. *American Journal of Veterinary Research*, **54**: 2056-2059.

Lamb T. J., Le Goff L., Kurniawan A., Guiliano D. B., Fenn K., Blaxter M. L., Read A. F., Allen J. E. (2004). Most of the response elicited against Wolbachia surface protein in filarial nematode infection is due to the infective larval stage. *Journal Infectious Diseases*, **189**: 120-127.

Lawrence R. A. & Thomas C. O. (1989). *Parasites: a guide to laboratory procedures and identification*, ASCP Press, USA, pp: 111.

Lee J. Ch., Lee Ch. Y., Shin S. S., Lee Ch. G. (1996). A survey of canine heartworm infections among German shepherds in South Korea. *Korean Journal of Parasitology*, **34**: 225-231.

Levy J. K., Crawford P. C., Lappin M. R., Dubovi E. J., Levy M. G., Alleman R., Tucker S. J., Clifford E. L. (2008). Infectious diseases of dogs and cats on Isabela Island, Galapagos. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **22**: 60-65.



- Levy J. K., Snyder P. S., Taveres L. M., Hooks J. L., Pegelow M. J., Slater M. R., Hughes K. L., Salute M. E.** (2003). Prevalence and risk factors for heartworm infection in cats from northern Florida. *Journal of the American Animal Hospital Association*, **39**: 533- 537.
- Levy J. K., Edinboro C. H., Glotfelty C. S., Dingman P. A., West A. L., Kirkland-Cady K. D.** (2007). Seroprevalence of *Dirofilaria immitis*, feline leukemia virus, and feline immunodeficiency virus infection among dogs and cats exported from the 2005 Gulf Coast hurricane disaster area. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **231**: 218-225.
- Ley K.** (2003). The role of selectins in inflammation and disease. *Trends in Molecular Medicine*, **9**: 263-268.
- Liu L. X., Buhlmann J. E., Weller P. F.** (1992). Release of prostaglandin E2 by microfilariae of *Wuchereria bancrofti* and *Brugia malayi*. *The American Journal of Tropical Medicine and Higiene*, **46**: 520-523.
- Liu L. X., Serhan C. N., Weller P. F.** (1990). Intravascular filarial parasites elaborate cyclooxygenase-derived eicosanoids. *The Journal of Experiental Medicine*, **172**: 993-996.
- Liu L. X. & Weller M. F.** (1989). *Brugia malayi*: microfilarial polyunsaturated fatty acid composition and synthesis. *Experimental Parasitology*, **69**: 198-203.
- Liu L. X. & Weller M. F.** (1990). Minireview, Arachidonic acid metabolism in filarial parasite. *Experimental Parasitology*, **71**: 496-501.
- Liu L. X. & Weller P. F.** (1992). Intravascular filarial parasites inhibit platelet aggregation. Role of parasite-derived prostanoids. *The Journal of Clinical Investigation*, **89**: 1113-1120.
- Lok J. B.** (1988). *Dirofilaria* sp: Taxonomy and distribution. En: Boreham P. F. L., Atwell R. B. (Eds.). *Dirofilariasis*, CRC Press Inc, USA, pp: 1-28.
- Longhofer S. L., Daurio C. P., Plue R. E., Alva R., Wallace D. H., Roncalli R. A.** (1995). Ivermectin for the prevention of feline heartworm disease. En: Soll M. D., Kinght D. H. (Eds.), *Proceedings of the Heatworm Symposium '95*, American Heartworm Society, USA, pp: 177-182.



- Longworth D. L., Foster D. W., Dvorak A. M., Weller P. F.** (1985). Incorporation of arachidonic acid by microfilariae of *Brugia malayi*. *The Journal of infectious diseases*, **152**: 1317-1323.
- Longworth D. L., King D. C., Weller P. F.** (1987). Rapid uptake and esterification of arachidonic acid and other fatty acids by microfilariae of *Brugia malayi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **23**: 275-284.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.** (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, **193**: 265-275.

M

- Ma S., Shaw S. K., Yang L., Jones T., Liu Y., Nusrat A., Parkos C. A., Luscinskas F. W.** (2003). Dynamics of junctional adhesion molecule 1 (JAM1) during leukocyte transendothelial migration under flow *in vitro*. *FASEB Journal*, **17**: 1189.
- Maltezos E. S., Sivridis E. L., Giatromanolaki A. N., Simopoulos C. E.** (2002). Human subcutaneous dirofilariasis: a report of three cases manifesting as breast or axillary nodules. *Scottish Medical Journal*, **47**: 86-88.
- Mamdouh Z., Chen X., Pierini L. M., Maxfield F. R., Muller W. A.** (2003). Targeted recycling of PECAM from endothelial surface-connected compartments during diapedesis. *Nature*, **421**: 748-753.
- Manfredi M. T., Vieira C., Bandi C., Casiraghi M., Simón F.** (2001). Phylogeny, systematics and structural aspects. En: Simón F., Genchi C. (Eds.), Heartworm infection in humans and animals, *Ediciones Universidad de Salamanca*, España, pp: 121-133.
- Marcos-Atxutegi C., Gabrielli S., Kramer L. H., Cancrini G., Simón F.** (2004). Antibody response against *Dirofilaria immitis* and the *Wolbachia* endosymbiont in naturally infected canine and human hosts. En: Mas-Coma S. (Ed.), Proceedings of the IX European Multicolloquium of Parasitology (EMOP IX), *Editorial Medimond*, Italia, pp: 297-302.
- Marcos-Atxutegi C., Kramer L. H., Fernández I., Simoncini L., Genchi M., Prieto G., Simón F.** (2003). Th₁ response in BALB/c mice immunized with *Dirofilaria*



- immitis* soluble antigens: a possible role for *Wolbachia*? *Veterinary Parasitology*, **112**: 117-130.
- Marks C. A. & Bloomfield T. E.** (1998). Canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) detected in red foxes (*Vulpes vulpes*) in urban Melbourne. *Veterinary Parasitology*, **78**: 147-154.
- Marquardt W. C., Demaree R. S., Grieve R. B.** (2000). Parasitology and Vector Biology. *Harcourt Academic Press*, USA, 702 pp.
- Masseron T., Saillol L., Neil J., Floch J.** (1996). Dirofilariose Conjuntivale à *Dirofilaria repens* : à propos d'un cas français. *Médical Tropical*, **56**: 457-458.
- Martín-Padura I., Lostaglio S., Schneemann M., Williams L., Romano M., Fruscella P., Panzeri C., Stoppacciaro A., Ruco L., Villa A., Simmons D., Dejana E.** (1998). Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *Journal of Cell Biology*, **142**: 117-127.
- Matheny H. E., Deem T. L., Cook-Mills J. M.** (2000). Lymphocyte migration through monolayers of endothelial cell lines involves VCAM-1 signaling via endothelial cell NADPH oxidase. *Journal of Immunology*, **164**: 6550-6559.
- Matola Y. G.** (1991). Periodicity of *Dirofilaria immitis* microfilariae in a dog from Muheza district, Tanzania. *Journal of Helminthology*, **65**: 76-78.
- McCall J. W.** (1992). A parallel between experimentally induced canine and feline heartworm disease, Proceedings of XVII WSAVA World Congress, 24th-27th September 1992, *Delfino Publisher*, Italia, pp: 255-261.
- McCall J. W.** (1998). Ricerca e dati sperimentali. En: Genchi C., Venco L., Vezzoni A. (Eds.), La filariosi cardiopolmonare del cane e del gatto, *Editorial SCIVAC*, Italia, pp: 47-54.
- McCall J. W.** (2001). Experimental infections in animal models. In: Simón F., Genchi C. (Eds.), Heartworm Infection in humans and animals, *Ediciones Universidad de Salamanca*, España, pp: 147-159.
- McCall J. W., Calvert C. A., Rawlings C. A.** (1994). Heartworm infection in cats: A life-threatening disease. *Veterinary Medicine*, **89**: 639-648.



- McCall J. W., Genchi C., Kramer L. H., Guerrero J., Venco L.** (2008). Chapter 4 heartworm disease in animals and humans. *Advances in Parasitology*, **66**: 193-285.
- McCall J. W., Jun J. J., Bandi C.** (1999). *Wolbachia* and the antifilarial properties of tetracycline. An untold story. *The Italian Journal of Zoology*., **66**: 7-10.
- McCall J. W., Supakorndej N., Ryan W., Soll M. D.** (1995). Utility of an ELISA-based antibody test for detection of heartworm infection in cats. In: Soll M. D., Knight D. H. (Eds.), Proceedings of the Heartworm Symposium '95, *American Heartworm Society*, USA, pp: 127-133.
- McGarry H. F, Pfarr K., Egerton G., Hoerauf A., Akue J. P., Enyong P., Wanji S., Kläger S. L., Bianco A. E., Beeching N. J., Taylor M. J.** (2003). Evidence against *Wolbachia* symbiosis in *Loa loa*. *Filaria Journal*, **2**: 9.
- McLaren D. J., Works M. J., Lawrence B. R., Simpson M. G.** (1975). Micro-organisms in filarial larvae (Nematoda). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **69**: 509-514.
- McLeroy L. W.** (1998). Evaluation of melarsomine dihydrochloride for adulticidal activity against *Dirofilaria immitis* in cats with intravenously transplanted adult heartworms. *Thesis for Master of Science Degree*, pp: 95.
- McTier T. L., McCall J. W., Dzimianski M. T., Mansour A. E., Jernigan A., Clark J. N., Plue R. E., Daurio C. P.** (1992). Prevention of heartworm infection in cats by treatment with ivermectin at one month post-infection. En: Soll M. D. (Ed.), Proceedings of the Heartworm Symposium '92, *American Heartworm Society*, USA, pp: 111-116.
- Mejía J. S. & Carlow C. K.** (1994). An analysis of the humoral immune response of dogs following vaccination with irradiated infective larvae of *Dirofilaria immitis*. *Parasite Immunology*, **16**: 157-164.
- Meyer H. P., Wolvekamp P., van Maasen C., Stokhof A. A.** (1994). Seven cases of heartworm disease (Dirofilariosis) in dogs in the Netherlands. *The Veterinary quarterly*, **16**: 169-174.
- Meyer D. J., Muimo R., Thomas M., Coates D., Isaac R. E.** (1996). Purification and characterization of prostaglandin-H E-isomerase, a sigma-class glutathione S-transferase, from *Ascaridia galli*. *The Biochemical of journal*, **313**: 223-227.



- Millan J., Hewlett L., Glyn M., Toomre D., Clark P., Ridley A. J.** (2006). Lymphocyte transcellular migration occurs through recruitment of endothelial ICAM-1 to caveola- and F-actin-rich domains. *Nature of Cell Biology*, **8**: 113-123.
- Miyoshi T., Tsubouchi H., Iwasaki A., Shiraishi T., Nabeshima K., Shirakusa T.** (2006). Human pulmonary dirofilariasis: A case report and review of the recent Japanese literature. *Respirology*, **11**: 343-347.
- Moise N. S.** (1988). Echocardiography. En: Fox P. R. (Ed.), *Canine and Feline Cardiology*, Churchchill Livingstone Inc, USA, pp: 113-156.
- Montoya J. A., Morales M., Ferrer O., Molina J. M., Corbera J. A.** (1998). The prevalence of *Dirofilaria immitis* in Gran Canaria, Canary Islands, Spain (1994-1996). *Veterinary Parasitology*, **75**: 221-226.
- Montoya J. A., Morales M., Juste M. C., Bañares A., Simón F., Genchi C.** (2006). Seroprevalence of canine heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) on Tenerife Island: an epidemiological update. *Parasitology Research*, **100**: 103-105.
- Montoya J. A., Morales M., Juste M. C., Corbera J. A.** (2007). Heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs: current update in Spain. En: Genchi C., Ronaldi L., Cringoli G. (Eds.), *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat and human infections, Rolando Editore, Italia, pp: 175-180.
- Morchón R., Bargues M. D., Latorre J. M., Melero-Alcíbar R., Pou-Barreto C., Mas-Coma S., Simón F.** (2007a). Haplotype H1 of *Culex pipiens* implicated as natural vector of *Dirofilaria immitis* in an endemic area of Western Spain. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, **7**: 653-658.
- Morchón R., Bazzocchi C., López-Belmonte J., Martín-Pacho J. R., Kramer L. H., Grandi G., Simón F.** (2007b). iNOs expresión is stimulated by the major surface protein (WSP) from *Wolbachia* symbiont bacteria of *Dirofilaria immitis* in a murine model of immunization. *Parasitology International*, **56**: 71-75.
- Morchón R., Ferreira A. C., Martín-Pacho J. R., Montoya A., Mortarino M., Genchi C., Simón F.** (2004). Specific IgG antibody response against antigens of *Dirofilaria immitis* and its *Wolbachia* endosymbiont bacterium in cats with natural and experimental infections. *Veterinary Parasitology*, **125**: 313-321.



- Morchón R., López-Belmonte J., Bazzocchi C., Grandi G., Kramer L. H., Simón F.** (2007c). Dogs with patent *Dirofilaria immitis* infection have higher expression of circulating IL-4, IL-10 and iNOs mRNA than those with occult infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **115**: 184-188.
- Morchón R., López-Belmonte J., Rodríguez-Barbero A., Simón F.** (2006). High levels of serum Thromboxane B2 are generated during human pulmonary dirofilariosis. *Clinical and Vaccine Immunology*, **13**: 1175-1176.
- Morchón R., Roca F., López-Belmonte J., Genchi M., Venco L., Rodríguez-Barbero A., Simón F.** (2007d). Changes in the levels of eicosanoids in cats naturally and experimentally infected with *Dirofilaria immitis*. *Veterinary Parasitology*, **147**: 271-275.
- Morini S., Venco L., Fagioli P., Genchi C.** (1998). Surgical removal of heartworms versus melarsomine treatment of naturally infected dogs with risk of thromboembolism. En: Seward R. L. (Ed.), Proceedings of the American Heartworm Symposium '98, *American Heartworm Society*, USA, pp: 235-340.
- Muller W. A.** (2003). Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends and Immunology*, **24**: 326-333.
- Mupanomunda M., Williams, J. F., Mackenzie C. D., Kaiser L.** (1997). *Dirofilaria immitis*: heartworm infection alters pulmonary artery endothelial cell behaviour. *Journal of Applied Physiology*, **82**: 389-398.
- Muro A., Genchi C., Cordero M., Simón F.** (1999). Human dirofilariosis in the European Union. *Parasitology Today*, **15**: 386-389.

N

- Needleman P., Turk J., Jakschik B. A., Morrison A. R., Lefkowitz J. B.** (1986). Arachidonic acid metabolism. *Annual Review of Biochemistry*, **55**: 69-102.
- Nelson C. T.** (1998). Incidence of *Dirofilaria immitis* in shelter cats from Southeast Texas. En: Seward R. L. (Ed.), Proceedings of the American Heartworm Symposium '98, *American Heartworm Society*, USA, pp: 63-66.
- Neufeld G., Cohen T., Gengrinovitch S., Poltorak Z.** (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB Journal*, **13**: 9-22.



- Newman P. J. & Newman D. K.** (2003). Signal transduction pathways mediated by PECAM-1: new roles for an old molecule in platelet and vascular cell biology. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **23**: 953-964.
- Niwetpathomwat A., Kaewthamasorn M., Tiawsirisup S., Techangamsuwan S., Suvarnvibhaja S.** (2007). A retrospective study of the clinical hematology and the serum biochemistry tests made on canine dirofilariasis cases in an animal hospital population in Bangkok, Thailand. *Research in Veterinary Science*, **82**: 364-369.
- Nourshargh S., Krombach F., Dejana E.** (2006). The role of JAM-A and PECAM-1 in modulating leukocyte in filtration in inflamed and ischemic tissues. *Journal of Leukocyte Biology*, **80**: 714-718.
- Nozais J. P., Bain O., Gentilini M.** (1994). A case of subcutaneous *Dirofilaria (Nochtiella) repens* with microfilaremia originating in Corsica. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, **87**: 183-185.
- Nuszkowski A., Grabner R., Marsche G., Unbehaun A., Malle E., Heller R.** (2001). Hypochlorite-modified low density lipoprotein inhibits nitric oxide synthesis in endothelial cells via an intracellular dislocalization of endothelial nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry*, **276**: 14212-14221.
- O**
- O'Neill S. L., Giordano R., Colbert A. M. E., Karr T. L., Robertson H. M.** (1992). 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89**: 2699-2702.
- Ockenhouse C. F., Tegoshi T., Maeno Y., Benjamin C., Ho M., Kan K. E., Thway Y., Win K., Aikawa M., Lobb R. R.** (1992). Human vascular endothelial cell adhesion receptors for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes: roles for endothelial leukocyte adhesion molecule 1 and vascular cell adhesion molecule 1. *The Journal of Experimental Medicine*, **176**: 1183-1189.
- Oge H., Doğanay A., Oge S., Yildirim A.** (2003). Prevalence and distribution of *Dirofilaria immitis* in domestic dogs from Ankara and vicinity in Turkey. *Deutsche tierärztliche Wochenschrift*, **110**: 69-72.



- Olteanu G.** (1996). Dirofilarosis in man and animals in Romania. En: Proceedings of VII European Multicolloquium of Parasitology. *Parassitologia*, **38**: 360.
- Orihel T. C.** (1961). Morphology of the larval stages of *Dirofilaria immitis* in the dog. *The Journal of Parasitology*, **47**: 251–262.
- Ortega-Mora L. M., Gómez M., Rojo-Vázquez F. A., Ródenas A., Guerrero J.** (1991). A survey of the prevalence of canine filariasis in Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, **11**: 63-68.
- Oswald I. P., Eltoun I., Wynn T. A., Schwartz B., Caspar P., Paulin D., Sher A., James S. L.** (1994). Endothelial cells are activated by cytokine treatment to kill an intravascular parasite, *Schistosoma mansoni*, through the production of nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**: 999-1003.

P

- Pampiglione S. & Rivasi F.** (2000). Human dirofilariasis due to *Dirofilaria (Nochtiella) repens*: an update of World literatura from 1995 to 2000. *Parassitologia*, **42**: 235-254.
- Pampiglione S., Rivasi F., Vakalis N.** (2000). Human pulmonary dirofilariasis: The first case observed in Greece. *Annales de Pathologie*, **20**: 626-628.
- Parekh R. B. & Edge C. J.** (1994). Selectins-glycoprotein targets for therapeutic intervention in inflammation. *Trends in Biotechnology*, **12**: 339-345.
- Paul A. J., Acre K. E., Todd K. S., Wallace D. H., Jernigan A. D., Wallig M. A.** (1992). Efficacy of ivermectin against *Dirofilaria immitis* in cats 30 and 45 days post-Infection. En: Soll M. D. (Ed.), *Proceedings of the Heartworm Symposium '92*, American Heartworm Society, USA, pp: 117-119.
- Perera L., Muro A., Cordero M., Villar E., Simón F.** (1994). Evaluation of a 22 kDa *Dirofilaria immitis* antigen for the immunodiagnosis of human pulmonary dirofilariosis. *Tropical Medicine and Parasitology*, **45**: 249-252.
- Pérez-Sánchez R., Gómez-Bautista M., Grandes A. E.** (1989). Canine filariasis in Salamanca (northwest Spain). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **83**: 143-150.



- Peters-Golden M. & Brosk T. G.** (2001). Intracellular compartmentalization of leukotriene synthesis: unexpected nuclear secrets. *FEBS Letters*, **487**: 323-326.
- Petrocheilou V., Theodorakis M., Williams J., Prifti H., Georgilis K., Apostolopoulou I., Mavrikakis M.** (1998). Microfilaremia from a *Dirofilaria*-like parasite in Greece. *APMIS*, **106**: 315-318.
- Pfarr K. M., Qazi S., Fuhrman J. A.** (2001). Nitric oxide synthase in filariae: demonstration of nitric oxide production by embryos in *Brugia malayi* and *Acanthocheilonema viteae*. *Experimental Parasitology*, **97**: 205-214.
- Piacenza L., Peluffo G., Radi R.** (2001). L-arginine-dependent suppression of apoptosis in *Trypanosoma cruzi*: contribution of the nitric oxide and polyamine pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**: 7301-7306.
- Pober J. S., Kluger M. S., Schechner J. S.** (2001). Human endothelial cell presentation of antigen the homing of memory/effector T cells to skin. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **941**: 12-25.
- Polizopoulou Z. S., Koutinas A. F., Saridomichelakis M. N., Patsiskas M. N., Leontidis L. S., Roubies N. A., Desiris A. K.** (2000). Clinical and laboratory observations in 91 dogs infected with *Dirofi laria immitis* in northern Greece. *The Veterinary Record*, **146**: 466-469.
- Pónyai K., Wikonkál N., Bottlik G., Hársing J., Kucsera I., Horváth A., Kárpáti S.** (2006). *Dirofilaria repens* infection case in Hungary: a case report. *Journal of the German Society of Dermatology*, **4**: 1051-1053.
- Postnova V. F., Kovtunov A. I., Abrosimova L. M., Avdiukhina T. I., Mishina L. I., Pogorel'chuk T., Oleĭnik V. A., Beshko N. I.** (1997). New cases of human dirofilariasis. *Meditssinskaia Parazitologiia i Parazitarnye Bolezni*, **1**: 6-9.
- Prieto G., Simón F., Genchi C., Bandi C., Alcoba S., Morchón R., Ceciliani F.** (2005). Método de diagnóstico inmunológico de la dirofilariosis felina. N° solicitud: P200200561. N° de publicación: 2228208. Entidad titular: Chemical Ibérica Productos Veterinarios S.L. País: España.
- Prieto C., Venco L., Simon F., Genchi C.** (1997). Feline heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection: detection of specific IgG for the diagnosis of occult infections. *Veterinary Parasitology*, **70**: 209-217.



Prosl H., Schwendenwein I., Kolm U. (2003). Dirofilariosis in Austria. En: Auer H., Hörweg C., Prosl H., Sattmann H (Eds.), *Helminthological Colloquim*, Wien, *Austrian Society of Tropical Medicine and Parasitology*, pp: 14.

Punkosdy G. A., Dennis V. A., Lasater B. L., Tzertzinis G., Foster J. M., Lammie P. J. (2001). Detection of serum IgG antibodies specific for *Wolbachia* surface protein in rhesus monkeys infected with *Brugia malayi*. *The Journal of Infectious Diseases*, **184**: 385-389.

Q

Quiroz-Romero H. (1984). Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. *Editorial Limusa*, pp: 876.

R

Raccurt C. P. (1999). La dirofilariose, zoonose émergente et mèconnue en France. *Médecine Tropicale*, **59**: 389-400.

Radmark O. (2002). Arachidonate 5-lipoxygenase. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, **68-69**: 211-234.

Ramaswamy K., He Y. X., Salafsky B. (1997). ICAM-1 and iNOS expression increased in the skin of mice after vaccination with gamma-irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. *Experimental Parasitology*, **86**: 118-1132.

Ramaswamy K., Kumar P., He Y. X. (2000). A role for parasite-induced PGE2 in IL-10-mediated host immunoregulation by skin stage schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *Journal of Immunology*, **165**: 4567-4574.

Rao U. R., Zometa C. S., Vickery A. C., Kwa B. H., Nayar J. K., Sutton E. T. (1996). Effect of *Brugia malayi* on the growth and proliferation of endothelial cells *in vitro*. *The Journal of Parasitology*, **82**: 550-556.

Rawlings C. A. & Calvert C. A. (1995). Heartworm disease. En: Ettinger S., Feldman (Eds.), *Text-book of Veterinary Internal Medicine*, *WB Saunders Co*, USA, pp: 1046-1068.

Ritter D. M. & McKerrow J. H. (1996). Intercellular adhesion molecule 1 is the major adhesion molecule expressed during schistosome granuloma formation. *Infection and Immunity*, **64**: 4706-4713.



- Rivasi F., Boldorini R., Criante P., Leutner M., Pampiglione S.** (2006). Detection of *Dirofilaria (Nochtiella) repens* DNA by polymerase chain reaction in embedded paraffin tissues from two human pulmonary locations. *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, **114**: 567-574.
- Rodes D.** (2006). Últimos datos epidemiológicos sobre filariosis canina. *Argos*, **52**.
- Rodríguez C., Raposo B., Martínez-González J., Casaní L., Badimon L.** (2002). Low density lipoproteins downregulate lysyl oxidase in vascular endothelial cells and the arterial wall. *Arterioscler. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **22**: 1409-1414.
- Rodríguez-Barbero A., Dorado F., Velasco S., Pandiella A., Banas B., López-Novoa J. M.** (2006). TGF-beta1 induces COX-2 expression and PGE2 synthesis through MAPK and PI3K pathways in human mesangial cells. *Kidney International*, **70**: 901-909.
- Roebuck K. A. & Finnegan A.** (1999). Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *Journal of Leukocyte Biology*, **66**: 876-888.
- Rohn D. A., Davis K. L., Mehlhorn U., Allen S. J., Laine G. A.** (1995). Myocardial edema and compromised left ventricular function attributable to dirofilariasis and cardiopulmonary bypass in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, **56**: 221-226.
- Roncalli R.A., Yamane Y., Nagata T.** (1998). Prevalence of *Dirofilaria immitis* in cats in Japan. *Veterinary Parasitology*, **75**: 81-89.
- Rosa A., Ribicich M., Betti A., Kistermann J. C., Cardillo N., Basso N., Hallu R.** (2002). Prevalence of canine dirofilariasis in the City of Buenos Aires and its outskirts (Argentina). *Veterinary Parasitology*, **109**: 261-264.
- Ruiz-Moreno J. M., Bornay-Llinares F. J., Prieto Maza G., Medrano M., Simón F., Eberhard M. L.** (1998). Subconjunctival infection with *Dirofilaria repens*: serological confirmation of cure following surgery. *Archives of Ophthalmology*, **116**: 1370-1372.
- Russell R. C. & Geary M. J.** (1996). The influence of microfilarial density of dog heartworm *Dirofilaria immitis* on infection rate and survival of *Aedes notoscriptus* and *Culex annulirostris* from Australia. *Medical and Veterinary Entomology*, **10**: 29-34.



Russell R. C., Webb C. E., Davies N. (2005). *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes polynesiensis* Marks (Diptera: Culicidae) in Moorea, French Polynesia: a study of adult population structures and pathogen (*Wuchereria bancrofti* and *Dirofilaria immitis*) infection rates to indicate regional and seasonal epidemiological risk for dengue and filariasis. *Journal of Medical Entomology*, **42**: 1045-1056.

Ryan G. R. & Newcomb K. M. (1995). Prevalence of Feline Heartworm Disease. A Global Review. En: Soll M. D., Knigh D. H. (Eds.), Proceedings of the Heartworm Symposium '95, *American Heartworm Society*, USA, pp: 79-86.

S

Sacks B. N. (1998). Increasing prevalence of canine heartworm infection in coyotes from California. *Journal of Wildlife Diseases*, **34**: 386-389.

Sala A. & Folco G. (2001). Neutrophils, endothelial cells, and cysteinyl leukotrienes: a new approach to neutrophil-dependent inflammation? (2001). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **283**: 1003-1006.

Santa-Ana M., Khadem M., Capela R. (2006). Natural infection of *Culex theileri* (Diptera: Culicidae) with *Dirofilaria immitis* (Nematoda: Filarioidea) on Madeira Island, Portugal. *Journal of Medical Entomology*, **43**: 104-106.

Sawyer T. K. (1965). Molting and exsheathment in vitro of third-stage *Dirofilaria immitis*. *The Journal of Parasitology*, **51**: 1016-1017.

Schmelz M. & Franke W. W. (1993) Complexus adhaerentes, a new group of desmoplakin-containing junctions in endothelial cells: The syndesmos connecting retothelial cells of lymph nodes. *European Journal of Cell Biology*, **61**, 274-289.

Schwan E. V. & Durand D. T. (2002). Canine filariasis caused by *Dirofilaria immitis* in Mozambique: a small survey based on the identification of microfilariae. *Journal of the South African Veterinary Association*, **73**: 124-126.

Schratl P., Royer J. F., Kostenis E., Ulven T., Sturm E. M., Waldhoer M., Hoefler G., Schuligoi R., Lippe I. T., Peskar B. A., Heinemann A. (2007). The role of the prostaglandin D2 receptor, DP, in eosinophil trafficking. *Journal of Immunology*, **179**: 4792-4799.



- Shaw S. K., Perkins B. N., Lim Y. C., Liu Y., Nusrat A., Schnell F. J., Parkos C. A., Luscinskas F. W.** (2001). Reduced expression of junctional adhesion molecule and platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD-31) at human vascular endothelial junctions by cytokines tumor necrosis factor- α plus interferon- γ does not reduce leukocyte transmigration under flow. *The American Journal of Pathology*, **159**: 2281-2291.
- Simón F. & Genchi C.** (2000). Dirofilariasis and other zoonotic filariases: an emerging public health problem in developed countries. *Research and Reviews in Parasitology*, **60**: 1-16.
- Simón F., Genchi C., Prieto G., Allende E.** (2001). Immunity in the vertebrate hosts. En: Simón F., Genchi C. (Eds.), Heartworm infection in humans and animals, *Ediciones Universidad de Salamanca*, España, pp: 83-101.
- Simón F., López-Belmonte J., Marcos-Atxutegi C., Morchón R., Martín-Pacho J. R.** (2005). What is happening outside North America regarding human dirofilariasis? *Veterinary Parasitology*, **133**: 181-189.
- Simón F., Morchón R., Marcos-Atxutegi C.** (2003a). Dirofilariosis animal y humana en Europa. *Argos*, **51**: 48-50.
- Simón F., Muro A., Cordero M., Martín J.** (1991). A seroepidemiologic survey of human dirofilariosis in Western Spain. *Tropical Medicine and Parasitology*, **42**: 106-108.
- Simón F., Prieto G., Morchón R., Bazzocchi C., Bandi C., Genchi C.** (2003b). Immunoglobulin G antibodies against the endosymbionts of filarial nematodes (*Wolbachia*) in patients with pulmonary dirofilariosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **10**: 180-181.
- Simón F., Kramer L. H., Román A., Blasini W., Morchón R., Marcos-Atxutegi C., Grandi G., Genchi C.** (2007). Immunopathology of *Dirofilaria immitis* infection. *Veterinary Research Communications*, **31**: 161-71.
- Simsek S., Utuk A. E., Koroglu E., Rishniw M.** (2008). Serological and molecular studies on *Dirofilaria immitis* in dogs from Turkey. *Journal of Helminthology*, **82**: 181-186.



- Sironi M., Bandi C., Sacchi L., Di Sacco B., Damiani G., Genchi C.** (1995). A close relative of the arthropods endosymbiont *Wolbachia* in a filarial worm. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **74**: 223-227.
- Smith W. L., DeWitt D. L., Garavito R. M.** (2000). Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annual review of biochemistry*, **69**: 145-182.
- Smith H. L. & Rajan T. V.** (2001). Inhibitors of the lipoxygenase pathway block development of *Brugia malayi* L3 in vitro. *The Journal of Parasitology*, **87**: 242-249.
- Slocombe J. O. D., Surgeoner G. A., Srivastava B.** (1989). Determination of the heartworm transmission period and its use in diagnosis and control. En: Otto G. F. (Ed.), Proceedings of the Heartworm Symposium '89, *American Heartworm Society*, USA, pp: 19-26.
- Solano-Gallego L., Llull J., Osso M., Hegarty B., Breitschwerdt E.** (2006). A serological study of exposure to molecular evidence of exposure to arthropod-borne pathogens in dogs from northeastern Spain. *Veterinary Research*, **37**: 231-244.
- Sofia C., Bacescu B., Coman T., Parvu Gh., Dinu C., Petrut T., Bercaru N., Amfim A.** (2007). Dirofilariosis in dogs and wild carnivores in Romania. En: Genchi C., Ronaldi L., Cringoli G. (Eds.), *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat and human infections, *Rolando Editore*, Italia, pp: 203.
- Sommer A., Rickert R., Fischer P., Steinhart H., Walter R. D., Liebau E.** (2003). A dominant role for extracellular glutathione S-transferase from *Onchocerca volvulus* is the production of prostaglandin D2. *Infection and Immunity*, **71**: 3603-3606.
- Szénási Z., Kovács A. H., Pampiglione S., Fioravanti M. L., Kucsera I., Tánzos B., Tiszlavicz L.** (2008). Human dirofilariosis in Hungary: an emerging zoonosis in central Europe. *Wiener klinische Wochenschrift*, **120**: 96-102.

T

- Tamashiro W. K., Powers K. G., Levy D. A., Scott A. L.** (1985). Quantitative and qualitative changes in the humoral response of dogs through the course of



- infection with *Dirofilaria immitis*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **34**: 292- 301.
- Tamashiro W. K., Rao M., Scott A. L.** (1987). Proteolytic cleavage of IgG and other protein substrates by *Dirofilaria immitis* microfilarial enzymes. *The Journal of Parasitology*, **73**: 149-154.
- Tarish J. H. & Atwell R. B.** (1993). The effect of prostaglandin inhibition on the development of pulmonary pathology associated with dead *Dirofilaria immitis*. *Veterinary Parasitology*, **49**: 207-217.
- Taylor M. J., Cross H. F., Bilo K.** (2000). Inflammatory responses induced by the filarial nematode *Brugia malayi* are mediated by lipopolysaccharide-like activity from endosymbiotic *Wolbachia* bacteria. *The Journal of Experimental Medicine*, **191**: 1429-1436.
- Taylor M. J., Bilo K., Cross H. F., Archer J. P., Underwood A. P.** (1999). 16S rDNA phylogeny and ultrastructural characterization of *Wolbachia* intracellular bacteria of the filarial nematodes *Brugia malayi*, *Brugia pahangi* and *Wuchereria bancrofti*. *Experimental Parasitology*, **91**: 356-361.
- Taylor M. J. & Hoerauf A.** (1999). *Wolbachia* bacteria of filarial nematode. *Parasitology Today*, **15**: 437-442.
- Tezuka H., Imai S., Tsukidate S., Fujita K.** (2002). A *Dirofilaria immitis* polyprotein up-regulates nitric oxide production. *Infection and Immunity*, **70**: 5283-5286.
- Theis J. H.** (2005). Public health aspects of dirofilariasis in the United States. *Veterinary Parasitology*, **133**: 157-180.
- Tithof P. F., Schwartz A. J., Mupanomunda M., Schwart N. R. Lamb V. L., Williams J. F., Kaiser L.** (1994). *Dirofilaria immitis*: depression of endothelium-dependent relaxation of canine femoral artery seen in vivo does not persist in vitro. *Experimental Parasitology*, **79**: 159-165.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **76**: 4350-4354.
- Trottein F., Descamps L., Nutten S., Dehouck M. P., Angeli V., Capron A., Cecchelli R., Capron M.** (1999a). *Schistosoma mansoni* activates host



microvascular endothelial cells to acquire an anti-inflammatory phenotype. *Infection and Immunity*, **67**: 3403-3409.

Trottein F., Nutten S., Angeli V., Delerive P., Teissier E., Capron A., Staels B., Capron M. (1999b). *Schistosoma mansoni* schistosomula reduce E-selectin and VCAM-1 expression in TNF-alpha-stimulated lung microvascular endothelial cells by interfering with the NF-kappaB pathway. *European Journal of Immunology*. **29**: 3691-3701.

Tuerner G. (1997). Cerebral malaria. *Brain Pathology*, **7**: 569-582.

V

Valladares B., Gijón H., López-Román R. (1987). *Dirofilaria immitis* en la isla de Tenerife. Algunos datos de su fisiopatología. *Revista Ibérica de Parasitología*, **47**: 377-380.

van Kempen M. J. & Jongsma H. J. (1999). Distribution of connexin37, connexin40 and connexin43 in the aorta and coronary artery of several mammals. *Histochemistry and Cell Biology*, **112**: 479-486.

Venco L. (1993). Approccio diagnostico alla sindrome della vena cava. *Veterinaria*, **7**: 11-18.

Venco L. (2007a). Heartworm (*Dirofilaria immitis*) disease in dogs. En: Genchi C., Ronaldi L., Cringoli G. (Eds.), *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat and human infections, *Rolando Editore*, Italia, pp: 117-125.

Venco L. (2007b). Heartworm (*Dirofilaria immitis*) disease in cats. En: Genchi C., Ronaldi L., Cringoli G. (Eds.), *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat and human infections, *Rolando Editore*, Italia, pp: 127-132.

Venco L., Borgarelli M., Ferrari E., Morini S., Genchi C. (1998a). Surgical removal of heartworms from naturally-infected cats. En: Seward R. L. (Ed.), Recent Advances in Heartworm Disease: Symposium '98, *American Heartworm Society*, USA, pp: 241-246.

Venco L., Calzolari D., Mazzocchi D., Morini, S. (1998b). The Use of echocardiography as a diagnostic tool for detection of feline heartworm (*Dirofilaria immitis*) infections. *Feline Practice*, **26**: 6-9.



- Venco L., McCall J.W., Guerrero J., Genchi C.** (2004). Efficacy of long-term monthly administration of ivermectin on the progress of naturally acquired heartworm infection in dogs. *Veterinary Parasitology*, **124**, 259-268.
- Venco L. & Vezzoni A.** (2001). Heartworm (*Dirofilaria immitis*) disease in dogs and cats. En: Simón F., Genchi C. (Eds.), Heartworm infection in humans and animals, *Ediciones Universidad de Salamanca*, España, pp: 161-177.
- Vermes I., Haanen C., Steffens-Nakken H., Reutelingsperger C.** (1995). A novel assay for apoptosis: flow cytometric detection of phosphatidyl serine expression on early apoptotic cells using fluorescein-labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods*, **184**: 39-51.
- Vezzani D., Eiras F. D., Wisnivesky C.** (2006). Dirofilariasis in Argentina: Historical review and first report of *Dirofilaria immitis* in a natural mosquito population. *Veterinary Parasitology*, **136**: 259-273.
- Vincent A. L., Partono J. K., Ash L. R.** (1975). A comparison of the body wall ultrastructure of *Brugia pahangi* with that of *Brugia malayi*. *The Journal of Parasitology*, **63**, 567-570.
- Volk T. & Kox W. J.** (2000). Endothelium function in sepsis. *Inflammation Research*, **49**: 185-198.
- Voller A., Bartlett A., Bidwell D. E.** (1978). Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *Journal of Clinical Pathology*, **31**: 507-520.
- Voros K., Kiss G., Baska F., Bagdi N., Szell Z.** (2000). Heartworm disease in dogs. Review article and case report. *Magyar Allatorosok Lapja*, **122**: 106-108.

W

- Williams L. A. Martin-Padura I., Dejana E., Hogg N., Simmons D. L.** (1999). Identification and characterisation of human Junctional Adhesion Molecule (JAM). *Molecular Immunology*, **36**: 1175-1188.
- Winston S. E., Fuller S. A., Hurrell J. G. R.** (1987). Western blotting. En: Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A. and Struhl K. (Eds.), Current protocols in molecular biology, *John Wiley & sons*, USA, pp: 10.8.1-10.8.6.



Wohlsein P., Vilafranca M., Brandes B. 1996. Leishmaiose und Filariose bei einem Hund. *Kleintierpraxis*, **41**: 367–374.

Wu M., Sun L. V., Vamathevan J., Riegler M., Deboy R., Brownlie J. C., McGraw E. A., Martin W., Esser C., Ahmadinejad N., Wiegand C., Madupu R., Beanan M. J., Brinkac L. M., Daugherty S. C., Durkin A. S., Kolonay J. F., Nelson W. C., Mohamoud Y., Lee P., Berry K., Young M. B., Utterback T., Weidman J., Nierman W. C., Paulsen I. T., Nelson K. E., Tettelin H., O'Neill S. L., Eisen J. A. (2004). Phylogenomics of the reproductive parasite *Wolbachia pipientis* wMel: a streamlined genome overrun by mobile genetic elements. *PLoS Biology*, **2**: E69.

X

Xie X., Bain O., Williams S. A. (1994). Molecular phylogenetic studies on filarial parasite based on 5S ribosomal spacer sequences. *Parasite*, **1**: 141-151.

Y

Yadav R., Larbi K. Y., Young R. E., Nourshargh S. (2003). Migration of leucocytes through the vessel wall and beyond. *Thrombosis and Haemostasis*, **90**: 598-606.

Yildirim A., Ica A., Atalay O., Duzlu O., Inci A. (2007). Prevalence and epidemiological aspects of *Dirofilaria immitis* in dogs from Kayseri Province, Turkey. *Research in Veterinary Science*, **82**: 358-363.

Z

Zimmerman G. L., Knapp S. E., Foreyt W. J., Ereksn N. T., Mackenzie G. (1992). Heartworm infections in dogs in Northwestern United States and British Columbia, Canada. En: Soll M. D. (Ed.), Proceedings Heartworm Symposium '92, *American Heartworm Society, USA*, pp: 15-20.

ANEXO



ANEXO





1. Tampones generales.

Tampón fosfato (PBS) pH 7,2

Di-sodio hidrógeno fosfato anhidro	1,07 g
Sodio di-hidrógeno fosfato 2-hidrato	0,39 g
Cloruro sódico	8,5 g
Agua destilada	Hasta 1L

2. Tampones para la obtención de WSPR.

Medio LB pH 7,0

Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro sódico	10 g
Agua bidestilada	Hasta 1L

Tampón urea 3M pH 8

Urea	180,18 g
Tris-aminometano	1,21 g
Sodio di-hidrógeno fosfato 2-hidrato	15,6 g

Imidazol 100 mM

Imidazol	0,01g
Agua bidestilada	100 ml

Tampón de lisis pH 8

Cloruro sódico	17,4 g
Imidazol 100 mM	0,38 g
Sodio di-hidrógeno fosfato 2-hidrato	7,8 g

Tampón urea 6M pH 8

Urea	360,36 g
Tris-aminometano	1,21 g
Sodio di-hidrógeno fosfato 2-hidrato	15,6 g

3. Tampones para ELISA de IgGs.

Tampón carbonato pH 9,6

Sodio carbonato anhidro	1,59 g
Sodio hidrógeno carbonato	2,93 g
Agua bidestilada	Hasta 1L

Tampón de lavado

Cloruro sódico	8,5 g
Tween ₂₀	0,5 ml
Agua destilada	Hasta 1L

**Tampón diluyente**

Cloruro sódico	1,7 g
Di-sodio hidrógeno fosfato anhidro	0,426 g
Sodio di-hidrógeno fosfato 2-hidrato	0,078 g
BSA	2 g
Tween ₂₀	0,05 ml
Agua destilada	Hasta 200 ml

Tampón OPD pH 5

Ácido cítrico 1-hidrato	2,14 g
Di-sodio hidrógeno fosfato anhidro	6,54 g
Agua bidestilada	Hasta 200 ml

Tampón Tween 20

Tween ₂₀	0,5 ml
PBS estéril	Hasta 1L

Ácido sulfúrico 3 N

Ácido sulfúrico 95-98%	80 ml
Agua destilada	920 ml

Tampón sustrato

Tampón OPD pH 5	10 ml
OPD	0,0028 g
Agua oxigenada 33%	0,004 ml

Tampón postapizante 1X 5X

BSA	0,2 g	1 g
PBS	20 ml	20 ml

4. Tampones para Western Blot.**Acrilamida/Bisacrilamida 30/0,8%**

Acrilamida	29,02 g
Bisacrilamida	0,8 g
Agua bidestilada	Hasta 100 ml

Tris 1 M pH 6,8

Tris-aminometano	12,11 g
Agua destilada	Hasta 100 ml

Tris 1,5 M pH 8,8

Tris-aminometano	36,63 g
Agua destilada	Hasta 200 ml

Persulfato amónico (PSA) 10 %

PSA	1 g
Agua destilada	10 ml

TRIS 2 M pH 6,8

Tris-aminometano	24,22 g
Agua bidestilada	Hasta 100 ml

**Gel de poliacrilamida**

<u>Gel de electroforesis</u> (20 ml/gel)	8%	10%	12%	15%
Agua bidestilada	9,30 ml	7,9 ml	6,6 ml	6,6 ml
Acrilamida/Bisacrilamida 30/0,8%	5,3 ml	6,7 ml	8,0 ml	8,0 ml
Tris 1,5 M pH 8,8	5,0 ml	5,0 ml	5,0 ml	5,0 ml
PSA 10%	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
TEMED	0,012 ml	0,008 ml	0,008 ml	0,008 ml

Gel de carga (4 ml/gel)

Agua bidestilada	2,7 ml
Acrilamida/Bisacrilamida 30/0,8%	0,67 ml
Tris 1,5 M pH 6,8	0,5 ml
PSA 10%	0,04 ml
TEMED	0,004 ml

Tampón de transferencia 1X pH 8,3

Glicina	14,26 g
Tris-aminometano	2,4 g
Agua destilada	Hasta 1L

Tampón de electroforesis 1X pH 8,3

Glicina	14,4 g
Tris-aminometano	3,02 g
SDS	1 g
Agua destilada	Hasta 1L

Tampón de lavado

Tween ₂₀	1 ml
Cloruro sódico 3 M	50 ml
Tris pH 7,5	20 ml
Agua bidestilada	Hasta 1L

Tampón de transferencia 1X pH 8,3

Glicina	14,26 g
Tris-aminometano	2,4 g
Agua destilada	Hasta 1L

Cloruro sódico 3 M

Cloruro sódico	87,66 g
Agua bidestilada	Hasta 500 ml

Tris pH 7,5

Tris-aminometano	60,55 g
Agua bidestilada	Hasta 500 ml

**Tampón de carga 4X**

β-mercaptoetanol	20 µl
SDS	2 g
Glicerol	10 ml
Tris 2 M (pH 6,8)	3,12 ml
Azul de bromofenol	1-2 mg
Agua bidestilada	Hasta 25 ml
Glicina	14,4 g
SDS	1 g
Tris-aminometano	3,02 g
Agua destilada	Hasta 1L

Tris 0,1M pH 9,35

Tris-aminometano	6,05 g
Agua bidestilada	Hasta 500 ml

Tampón de revelado*Tampón 1 (4 ml/gel)*

Tris 0,1M pH 9,35	500 ml
Luminol	390 mg
p-iodofenol	475 mg

Tampón 2 (4 ml/gel)

Tris 0,1M (pH 9,35)	500 ml
<u>Agua oxigenada 33%</u>	0,4 µl/gel

5. Tampones para inmunofluorescencia y ciclo celular.**Paraformaldehído al 10%**

Paraformaldehído	10 g
Hidróxido sódico 1N	Unas gotas
PBS	3 ml
PBS 2X	50 ml
Agua bidestilada	100 ml

Tampón de permeabilización

Tritón X-100	500 µl
BSA	1g
Azida al 10 %	2,5 ml
PBS CM	Hasta 500 ml

PBS CM

Sulfato de magnesio 7-hidrato	0,2465 g
Cloruro cálcico	0,11099 g
PBS 10X	100 ml
Agua bidestilada	Hasta 1L

Paraformaldehído al 4%

Paraformaldehído al 10%	2 ml
PBS	3 ml

Tampón NH₄Cl 50 mM “Quench”

Cloruro de amonio 500 mM	1 ml
PBS CM	9 ml

Alexa 546 Phalloidina 10U

Alexa 546 Phalloidina	300U
Metanol	1,5 ml

**NH₄Cl 500 mM**

NH ₄ Cl	2.675 g
PBS 10X	10 ml
Agua bidestilada	100 ml

6. Tampones para obtener extractos de proteínas celulares.**Tris 1 M (pH 7,5)**

Tris-aminometano	60,555 g
Agua destilada	Hasta 500 ml

Cloruro sódico 3 M

Cloruro sódico	87,66 g
Agua bidestilada	Hasta 500 ml

EDTA 0,5 M (pH 8)

EDTA	250 g
Agua bidestilada	Hasta 500 ml

Tampón de lisis

Tris 1 M (pH 7,5)	2 ml
Cloruro sódico 3 M	4,6 ml
EDTA 0,5 M (pH 8)	2 ml
Glicerol	10 ml
Igepal CA-630	1 ml
Agua bidestilada	Hasta 100 ml

Inhibidores de proteasas

Leupeptina (1mg/ml agua bidestilada)
Pepstatina A (1mg/ml metanol)
Aprotinina (1mg/ml agua bidestilada)
PMSF (100 mM isopropanol)

7. Tampones para cristal violeta.**Cristal violeta 0.2%**

Cristal violeta	0,2 g
Agua bidestilada	Hasta 100 ml

Ácido acético 10%

Ácido acético 96%	50 ml
Agua bidestilada	Hasta 500 ml





A

Ácido acético 96% (PROBUS, 188720).

Ácido cítrico 1-hidrato (PANREAC, 141018).

Ácido sulfúrico 95-98 % (PANREAC, 141058).

Acrilamida (PANREAC, 163309).

Agua oxigenada 33% (PANREAC, 141077).

Ampicilina (SIGMA-ALDRICH, A-0166).

Anti-IgG gato (CULTEK, 6080-01).

Anti-IgG humano (SIGMA-ALDRICH, I-4506).

Anti-IgG perro (SIGMA-ALDRICH, A-9042).

Anticuerpo Biotinilado (DAKOCYTOMATION, K0675).

Anticuerpos primarios:

- 5-LO (CHEMICON INTERNATIONAL INC, AB37976).
- α -tubulina (ONCOGENE RESEARCH PRODUCTS, CP06).
- COX-2 (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY INC, sc-1745).
- E-cadherina (BD TRANSDUCTION LABORATORIOS, 610181).
- eNOS (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY INC, sc-654).
- ICAM-1 (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY INC, sc-1511).
- iNOS (BD TRANSDUCTION LABORATORIOS, 610332).
- PCNA (BD TRANSDUCTION LABORATORIOS, P56720).
- PECAM-1 (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY INC, sc-1506).
- VCAM-1 (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY INC, sc-1504).
- VEGF (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY INC, sc-1836).

Anticuerpos secundarios:

- ➡ IgG de cabra anti-conejo (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY INC, sc-2004).
- ➡ IgG de cabra anti-ratón (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY INC, sc-2005).
- ➡ IgG de mono anti-cabra (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY INC, sc-2020).
- ➡ IgG de mono anti-cabra Alexa Fluor[®]488 (MOLECULAR PROBES, A-11055).

Aprotinina (SIGMA-ALDRICH, A-1153).

Azul de bromofenol (BIO-RAD, 161-0404).



Azul de *Coomassie* (BIO-RAD, 161-0435).

Azul de metileno (PANREAC, 251170).

B

β -mercaptoetanol (SIGMA-ALDRICH, 51673-2).

Bisacrilamida (BIO-RAD, 1610200).

Bisturí estéril (AESCULAP[®], 24691).

Botella de cultivo de 75 cm² (BECTON DICKINSON, 353084).

C

Cámara de *Neubauer* 0,0025 mm² (PAUL MARIENFELD GMBH & CO.KG).

Casette de revelado LR Regular 18x24 cm (RADIOLOGÍA, X-RAY CASSETTE).

Casette de revelado HR Regular 24x30 cm (FUJIFILM, X- RAY CASSETTE).

Casette para inclusión en parafina (BIO-ÓPTICA, 07-7300).

Cloruro de amonio (PANREAC, 141121).

Cloruro cálcico (PANREAC, 141219).

Cloruro sódico (PANREAC, 141659).

Cristal violeta (PANREAC, 251762).

Cromógeno (DAKOCYTOMATION, K3469).

Cubreobjetos 20x20 mm (MENZEL-GLASER).

Cubreobjetos 20x40 mm (MENZEL-GLASER).

D

Di-sodio hidrógeno fosfato anhidro (PANREAC, 141679).

Dimetil sulfóxido 99,9 % (DMSO) (SIGMA-ALDRICH, 154938).

Dodecil sulfato sódico (SDS) (SIGMA-ALDRICH, L-5750).

E

Eppendorfs de 1,5 ml (DELTALAB, 200400P).

Esponjas para cassette (BIO-ÓPTICA, 07-7290).

Estreptavidina-HRP (DAKOCYTOMATION, K0675).

Estreptomina (SIGMA-ALDRICH, S-9137).



Etanol absoluto desnaturalizado (CARLO ERBA, 308653).

Etilendiamina tetraacético tripotásico (EDTA) (SIGMA-ALDRICH, E-5134).

Extracto de levadura (PANREAC, 141086).

F

Factor de crecimiento endotelial (ECGS) (SIGMA-ALDRICH, E-2759).

Fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) 1g (SIGMA-ALDRICH, P-7626).

Filtro Millex[®] GP 0,22 µm (MILLIPORE, SLGP033RB).

Filtro Millex[®] HP 0,45 µm (MILLIPORE, SLHP033NB).

FITC-dextrano Mr 40000 250mg (SIGMA-ALDRICH, FD40).

Formaldehído 4% (PANREAC, 252931).

Formalina neutralizada al 10% v/v (J.T. BAKER).

Formol (Formaldehído 34-38%) (PANREAC, 141328).

G

Gelatina de cerdo (SIGMA-ALDRICH, G-1890).

Glicerol (PANREAC, 141339).

Glicina (PANREAC, 141340).

H

HAAE-1 (ATCC, CRL-2472).

Hematoxilina (SIGMA-ALDRICH, 51275).

Heparina (SIGMA-ALDRICH, H-3393).

Hidróxido sódico (PANREAC, 181693).

Hoestch 33258 (MOLECULAR PROBES, H-3569).

I

Igepal CA-630, NP-40 (SIGMA-ALDRICH, I-3021.)

Imidazol (SIGMA-ALDRICH, I-5513).

Inhibidor de COX-2 NS-398 (CALBIOCHEM, 349254).

Inserto de poliéster *Transwell*[®] 3µm (PET) (COSTAR, 34720).

Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) (BIO-RAD, 170-3201).



Isobutanol (PANREAC, 161089)








Isopropanol (2-propanol) (SIGMA-ALDRICH, 190764)

Ivermectina (CARDOTEK³⁰ FXTM, MERIAL, LTD.X)

K

Kanamicina 5g (SIGMA-ALDRICH, K-1377).

Kits:

-  Kit BCA (PIERCE, 23225)
-  Kit DC *protein Assay*, (BIO-RAD, 500-0116)
-  Kit ELISA *Parameter*TM PGE₂ *Assay* (R&D SYSTEMS, KGE004)
-  Kit ELISA TxB₂ *Immunoassay* (R&D SYSTEMS, DE0700)
-  Kit ELISA LTB₄ *Immunoassay* (R&D SYSTEMS, DE0275)
-  Kit *Total NO/Nitrite/Nitrate Immunoassay Parameter*TM (R&D SYSTEMS, KGE001)
-  Kit *Toxilight*[®] *BioAssay* (CAMBREX, LT17-217)

L

Luminol (SIGMA-ALDRICH, A-8511)

Leupeptina (SIGMA-ALDRICH, L-2023)

M

Marcador de peso molecular *Prestained*TM *Protein Ladder* (FERMENTAS, SM067)

Medio de cultivo Ham F12k (ATCC 30-2004)

Membrana de intercambio aniónico (SARTORIUS).

Membrana de Polivinilidenofluoruro (PVDF) (PALL GELMAN, 66543)

Metanol (PANREAC, 141091)

Micropipeta 0,2-2 µl (SOCOREX, CALIBRA[®] *DIGITAL* 822)

Micropipeta 1-10 µl (SOCOREX, *DIGITAL* 822)

Micropipeta 1-20 µl (SOCOREX, *DIGITAL* 822)

Micropipeta 10-100 µl (SOCOREX, *DIGITAL* 822)

Micropipeta 100-1000 µl (SOCOREX, *DIGITAL* 822)



Micropipeta multicanal 20-100 µl (SOCOREX, CALIBRA® *DIGITAL* 852)

N

N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) (BIO-RAD, 1610800)

O

Ortofenildiamina (OPD) (PANREAC, 254113)

Ortovanadato sódico (SIGMA-ALDRICH, S-6508)

P

p-iodofenol (SIGMA-ALDRICH, I1,020-1)

Papel *Whatman* (WHATMAN, 1001917)

Parafina (PANREAC, 253211)

Paraformaldehído (SIGMA-ALDRICH, C-6148)

Película de autorradiografía CL-X POSURE™ FILM 18x24 cm (PIERCE, 34089)

Penicilina (SIGMA-ALDRICH, P-7794)

Peniestreptomicina (BIOWHITTAKER™, DE17-602E)

Pepstatina A (SIGMA-ALDRICH, P-5318)

Persulfato amónico (PSA) (SIGMA-ALDRICH, A-3678)

Pipetas 5 ml (FALCON, 357543)

Pipetas 10 ml (FALCON, 357551)

Pipetas 25 ml (FALCON, 357525)

Placas de 35 mm (FALCON, 353006)

Placas de 60 mm (FALCON, 353004)

Placas de 100 mm (FALCON, 353003)

Placa de 6 pocillos (FALCON, 353046)

Placa de 24 pocillos (FALCON, 353047)

Placa de 96 pocillos para ELISA (Costar, 3369)

Portaobjetos 25x67x26 mm (MENZEL-GLASER, D-38116)

Portaobjetos tratado con polisina 25x75x10 mm (MENZEL-GLASER, J2800AMNZ)

Prolong® *Antifade Reagent* (MOLECULAR PROBES, P-36934)



R

Rascador de células de 23 cm (NUNC™, 179693)

S

Sodio carbonato anhidro (PANREAC, 141648)

Sodio di-hidrógeno fosfato 2-hidrato (PANREAC, 141677)

Sodio hidrógeno carbonato purísimo (PANREAC, 141638)

Solución acuosa especial para montar preparaciones (BIO-ÓPTICA, 05-1740)

Solución de *stripping* 10X (CHEMICON INTERNATIONAL, RE-BLOT *Plus* 2504)

Stericup 250 ml (MILLIPORE, SCGP U02 RE)

Stericup 500 ml (MILLIPORE, SCGP U05 RE)

Suero fetal bovino (FBS) (ATCC, 30-2020)

Suero fisiológico (B. BRAUN MEDICAL SA, 262890)

Suero de albúmina bovina (BSA) (SIGMA-ALDRICH, A-7906)

Sulfato de magnesio 7-hidrato (PROBUS, 121310)

T

Test:

- ▶ Test comercial *Canine Heartworm Antigen* Test Kit (IDEXX, 09278-MB-739)
- ▶ Test comercial Heska™ Solo Step™ (HESKA CORPORATION, 4370)
- ▶ Test *Limulus Amebocyte Lysate* (BIOWHITTAKER™, QCL-1000)
- ▶ Test Vybrant™ Apoptosis Assay (MOLECULAR PROBES, V-13240).

Triptona (MCM, MC-5)

Tripsina 0,25%/EDTA 0,03% (ATCC 30-2101)

Tris-aminometano (PANREAC, 141940)

Triton X-100, (SIGMA-ALDRICH, X-100)

Trypan blue (SIGMA-ALDRICH, 30,264-3)

Tubo al vacío de 3 ml para la extracción de sangre (VENOJECT, VT-053STK)

Tubo de 50 ml estéril (BECTON DICKINSON, 352098)

Tubo de 15 ml estéril (CORNING®, 430052)

Tubo de policarbonato estéril (DUEROLAB, 91106)



Tween₂₀ (PANREAC, 212312)

U

Urea (SIGMA-ALDRICH, U-0631)

V

Vacutainer 0,9 x 25 mm (PRECISION GLIDE™, 360214)

Vial 1,8 ml (criovial) (NALGE COMPANY, Sybin 5000,0020)

X

Xileno (PANREAC, 141769)





1. Agitador horizontal KS 125 (IKA LABORTECHNIK).
2. **Aparato de inclusión CD1000 (BIO-ÓPTICA).**
3. Baño cerrado herméticamente (SELECTA).
4. **Baño para extender la parafina (BIO-ÓPTICA).**
5. Bomba de vacío (GAST).
6. **Bombona de CO₂ (AIR LIQUIDE).**
7. Campana de flujo laminar Av-100 (TELSTAR).
8. **Campana de extracción de gases CE-150 (FIGURSA).**
9. Centrífuga refrigerada 5702 para eppendorfs (EPPENDORF).
10. **Centrífuga refrigerada BR4i para tubos de 1,5 ml (JOUAN).**
11. Cromatografía de afinidad de alta presión-HPLC
(AMERSHAM BIOSCIENCES).
12. **Congelador -20°C (IGNIS).**
13. Congelador de -80°C horizontal MDF-393 (SANYO).
14. **Criotomo RM 2155 (LEICA).**
15. Destilador 706 (POBEL).
16. **Equipo MilliQ 165 PLUS (MILLIPORE).**
17. Equipo Miniprotean® 3 para Western Blot (BIO-RAD).
18. **Espectofotómetro Microplate Reader-Benchmark (BIO-RAD).**
19. Espectofotómetro SmartSpec™ 3000 (BIO-RAD).
20. **Estufa con agitación vigorosa (HARAEUS).**
21. Estufa 6060 (HARAEUS).
22. **Fuente de alimentación Power/Pac Universal (BIO-RAD).**
23. Fluorímetro Fluoroskan Ascent FL (THERMO ELECTRON).
24. **Incubador de CO₂ Forma Series II (THERMO ELECTRON).**
25. Luminómetro Lumat LB9507 (BERTHOLD).
26. **Máquina de revelado M35X-OMAT Processor para películas autorradiográficas (KODAK).**
27. Microscopio óptico 867089 (NIKON).



**28. Microscopio invertido con fluorescencia Axiovert 200M y
con cámara digital Axiocam MRm (ZEISS).**

29. Microscopio invertido DM-IRB con cámara digital DFC 320 (LEICA).

30. Sonicador VC 50 (VIBRA CELL™).

31. Tanque de nitrógeno líquido (AIR LIQUIDE).

32. Vortex TEAXtop (HEIDOLPH).



PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS DOCTORAL



PVBLICACIONES

1. **Morchón R.**, López-Belmonte J., Rodríguez-Barbero A., Simón F. (2006). High levels of serum Thromboxane B₂ are generated during human pulmonary dirofilariosis. *Clinical and Vaccine Immunology*. **13**: 1175-1176.
2. **Morchón R.**, Roca F., López-Belmonte J., Genchi M., Venco L., Rodríguez-Barbero A., Simón F. (2007). Changes in the levels of eicosanoids in cats naturally and experimentally infected with *Dirofilaria immitis*. *Veterinary Parasitology*. **147**: 271-275.
3. **Morchón R.**, Rodríguez-Barbero A., Velasco S., López-Belmonte J., Simón F. (2008). Endothelial cell activation by adult *Dirofilaria immitis* somatic antigens. *Parasitology International*. (Aceptado).
4. Simón F., **Morchón R.**, Rodríguez-Barbero A., López-Belmonte J., Grandi G., Genchi C. (2008). *Dirofilaria immitis* and *Wolbachia*-derived antigens: Its effect on endothelial mammal cells. *Veterinary Parasitology*. (Aceptado).

PVBLICACIONES PENDIENTES

5. **Morchón R.**, Juste M. C., Montoya J. A., Pagés E., Rodríguez-Barbero A., Simón F. (2008). Are microfilariae related to the production of eicosanoids in dogs naturally infected with *Dirofilaria immitis*? *Research and Reviews in Parasitology (Revista Ibérica de Parasitología)*. (Enviado y recibido).



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA